

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. Volkmar Jansson

Analyse molekularer und zellulärer Komponenten des periprotetischen Gewebes bei aseptischer Endoprothesenlockerung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Eliza Sophie Hartmann
aus Stuttgart
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. med. Susanne Mayer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Florian Haasters
Priv. Doz. Dr. med. Christoph U. Schulz
Priv. Doz. Dr. med. Hermann Anetzberger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2016

*Für Mama und Papa
in Liebe und Dankbarkeit*

„Man sieht nur mit dem Herzen gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.“

Antoine de Saint-Exupery

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. Aseptische Endoprothesenlockerung	1
1.1.1. Osteoklastogenese	2
1.1.2. Osteoblastäre Komponente	5
1.1.3. Proteasen	5
1.1.4. Endotoxin	6
1.1.5. Periprothetische Fibroblasten-artige Zellen	7
1.1.6. Dreidimensionale Kulturen	9
1.1.7. Scaffold-freie Transwellmembran Kulturen	10
2. Fragestellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Material	12
3.1.1. Geräte	12
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	14
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.4. Zellkultur	17
3.1.5. Histologie und Immunhistochemie	18
3.1.5.1. Farben und Reagenzien	18
3.1.5.2. Antikörper und Seren	19
3.1.6. Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	19
3.1.7. Primer	20
3.1.8. Software	21
3.2. Methoden	22
3.2.1. Zellkultur	22
3.2.1.1. Allgemeine Bemerkungen	22
3.2.1.2. Einfrieren von Zellen	22
3.2.1.3. Auftauen der Zellen	22
3.2.1.4. Passagieren der Zellen	23
3.2.1.5. Zählen der Zellen	23

3.2.1.6. Zellgewinnung aus humanem Periimplantatgewebe und humanem Synovialgewebe.....	23
3.2.1.7. Kultivierung	26
3.2.1.7.1. Monolayer Kultivierung.....	26
3.2.1.7.2. Dreidimensionales Kultursystem	27
3.2.1.7.3. 24 Well Kultivierung	27
3.2.1.7.4. Versuchsdurchführung.....	27
3.2.2. Histologie und Immunhistochemie	28
3.2.2.1. Einbettung des Primärgewebes.....	28
3.2.2.2. Anfertigung von Paraffinschnitten	28
3.2.2.3. Einbettung der dreidimensionalen Kultursysteme	29
3.2.2.4. Anfertigung von Gefrierschnitten	29
3.2.2.5. Histologie	29
3.2.2.5.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	29
3.2.2.5.2. Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung	29
3.2.2.6. Immunhistochemie	30
3.2.2.6.1. CD68 Färbung	30
3.2.2.6.2. S100A4 und Doppelfärbung CD68/S100A4	31
3.2.3. Molekularbiologische Methoden	32
3.2.3.1. RNA Isolierung aus dem Monolayer.....	32
3.2.3.2. RNA Isolierung aus dem Primärgewebe und dem dreidimensionalen Kultursystem	33
3.2.3.3. cDNA Synthese	34
3.2.3.4. Quantitative Real Time PCR	35
3.2.4. Endotoxin-Testung.....	39
3.2.5. Statistik	39
4. Ergebnisse	40
4.1. Periprothetisches Gewebe und Synovialgewebe	40
4.1.1. Histologie und Immunhistochemie	42
4.1.2. Relative Quantifizierung mittels Light Cycler	44
4.1.2.1. Vergleich periprothetisches Gewebe mit Synovialgewebe	44
4.1.2.2. Endotoxin	46
4.1.2.3. Analyse von zementierten und zementfreien Prothesen	47
4.2. Periprothetische Fibroblasten-ähnliche Zellen	48
4.2.1. Histologie und Immunhistochemie	49
4.2.1.1. Monolayer Kultivierung	49

4.2.1.2. Transwellmembran Kultivierung	50
4.2.2. Relative Quantifizierung mittels Light Cyclers	52
5. Diskussion	61
5.1. Analyse molekularer Komponenten	61
5.2. Zelluläre Komponente bei aseptischer Endoprothesenlockerung ..	69
6. Zusammenfassung.....	75
7. Publikationen	78
8. Literaturverzeichnis	79
9. Abkürzungsverzeichnis	91
10. Abbildungsverzeichnis.....	93
11. Tabellenverzeichnis	96
Danksagung	97

1. Einleitung

1.1. Aseptische Endoprothesenlockerung

Die aseptische Endoprothesenlockerung stellt eine der häufigsten Komplikationen nach Einbau eines künstlichen Gelenkersatzes dar und geht meistens mit Osteolysen einher (Gallo et al., 2002).

Aseptische Endoprothesenlockerungen von Knie- und Hüftendoprothesen sind ein multifaktorielles Geschehen. Nach momentanem Stand der Forschung ist eine durch Abriebpartikel induzierte Entzündungsreaktion ursächlich für die Endoprothesenlockerung (Sabokbar et al., 2003; Tomankova et al., 2014). Im Bereich zwischen Prothese und Knochen kommt es zur Ausbildung eines periprothetischen Gewebes. Hier können Abriebpartikel der Endoprothesen von ansässigen Zellen phagozytiert werden. Auch die Art (Polyethylen, Metalle, Keramik, Zement), Menge und Größe der Abriebpartikel können sehr wahrscheinlich einen großen Einfluss auf die Entstehung der aseptischen Endoprothesenlockerung haben (Green et al., 2000). Im Normalfall zeigt die Menge der Abriebpartikel eine gute Korrelation mit der Ausbildung von Osteolysen (Dowd et al., 2000). Daneben scheinen auch andere Faktoren wie Implantatstabilität, Volumen der Gelenkflüssigkeit sowie Zug- und Scherkräfte einen Einfluss auf die aseptische Endoprothesenlockerung zu haben (Aspenberg and Van der Vis, 1998; Sundfeldt et al., 2006). Die Freisetzung verschiedener Zytokinen (TNF α , IL-1, IL-6, M-CSF), Prostaglandin E2 (PGE2) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) fördern eine weitere Einwanderung von Monozyten und Makrophagen sowie die Aktivierung und Ausbildung von Osteoklasten und eine Suppression der Osteoblasten (Crotti et al., 2004; Jamsen et al., 2014; Pap et al., 2001). Im PPG kommt es zu einer Dysregulation der RANK-L/RANK/OPG Achse (Grimaud et al., 2003; Mandelin et al., 2003; Veigl et al., 2007). Die erhöhte RANK-L Expression sowie die erniedrigte OPG Expression führt im PPG zu einer Erhöhung der RANK-L/OPG Ratio (Mandelin et al., 2003; Veigl et al., 2007).

1.1.1. Osteoklastogenese

Osteoklasten sind multinukleäre Zellen und entstehen aus der Fusion von peripheren osteoklastären Vorläuferzellen der makrozytären/monozytären Zelllinie (Sokos et al., 2014). Zusammen bilden Monozyten, Makrophagen und Osteoklasten das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS). Osteoklastäre Vorläuferzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab und gelangen mit der Blutzirkulation ins Gewebe (Crotti et al., 2004; Sabokbar et al., 2003). Die hämatopoetischen Osteoklasten Vorläuferzellen exprimieren NF- κ B (RANK) und differenzieren in Anwesenheit von Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF) und NF- κ B - Ligand (RANK-L) in TRAP positive Vorläuferzellen, die zu multinukleären Riesenzellen fusionieren (Dickerson et al., 2012; Kim and Kim, 2014; Maitra et al., 2010). Nach vollständiger Osteoklasten Differenzierung binden diese an die Knochenoberfläche und bilden einen Faltenaum, auch „ruffled boarder“ genannt und eine „sealing zone“ aus (Dickerson et al., 2012; Lindeman et al., 2004; Takahashi et al., 2007). Die „sealing zone“ besteht aus einem dicken Aktin Band und dient als Verbindung des Osteoklasten mit der Knochenoberfläche und trennt die Resorptionszone „Howship Lakune“ von der Umgebung (Takahashi et al., 2007). Im „Faltensaum“ entsteht durch den Protonentransport der H⁺-ATPase ein saures Milieu (Blair et al., 1989; Dickerson et al., 2012; Takahashi et al., 2007). Mit der Hilfe von Enzymen, wie tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP) und Cathepsin K kann der Knochen resorbiert werden (Maitra et al., 2010). Cathepsin K, eine Zysteinprotease ist an der Kollagen Destruktion in der extrazellulären Matrix beteiligt indem es die Tripelhelixstruktur des Kollagens in allen drei Ketten spalten kann (Garnero et al., 1998; Soderstrom et al., 2001). Cathepsin K, das vor allem im sauren Milieu aktiv ist (Lindeman et al., 2004) wird besonders im Faltenaum der Osteoklasten exprimiert (Avnet et al., 2006; Sassi et al., 2000). Bei verminderter Cathepsin K Expression kommt es zu einer Osteosklerosis der langen Knochen und der Rückenwirbel in Mäusen (Gelb et al., 1996). Bei Überexpression von Cathepsin K zeigt sich ein signifikanter Abbau des trabekulären Knochens (Avnet et al., 2006).

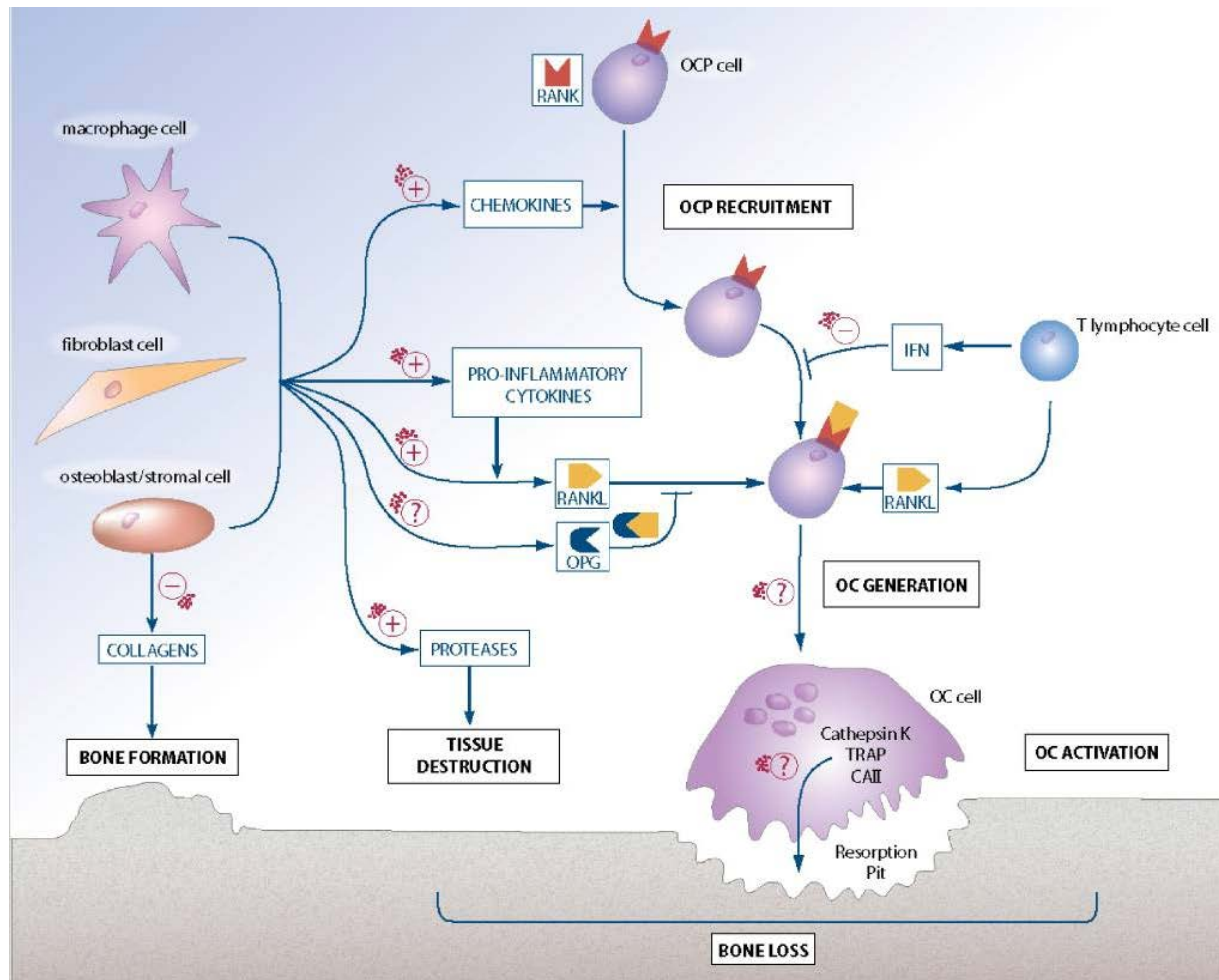


Abb. 1.1 Darstellung der zellulären und molekularen Wege der Osteoklastogenese nach Purdue et al. (Purdue et al., 2006).

RANK-L ist ein Rezeptor Aktivator für RANK, der vor allem von Osteoblasten, Fibroblasten, Knochenmarkzellen und Lymphozytenzellen gebildet wird und eine wichtige Rolle in der Regulation der Osteoklastogenese spielt (Granchi et al., 2005; Sabokbar et al., 2003). RANK-L spielt außerdem eine Rolle im Immunsystem, bei der T-Zell Proliferation und in der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen (Quinn et al., 2000).

RANK-L kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden: der erste ist RANK ein Typ I Transmembranrezeptor der Tumornekrose (TNF) Rezeptor Familie (Noordin and Masri, 2012), welcher von Monozyten, Makrophagen und osteoklastären Vorläuferzellen exprimiert wird (Granchi et al., 2005). Die Bindung von RANK-L an RANK stimuliert die Differenzierung von Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen unter der Anwesenheit von M-CSF (Dickerson et al., 2012; Walsh and Choi, 2014). M-CSF, auch bekannt als CSF-1, ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle in der Proliferation

und Differenzierung von Makrophagen, Monozyten und Osteoklasten sowie deren Vorläuferzellen spielt. M-CSF bindet an den CSF-1R Rezeptor der Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) (Otero et al., 2009). M-CSF kann von einer Reihe an Zellen produziert werden, wie zum Beispiel von Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten sowie Endothelzellen (Xu et al., 1997). Die Expression von M-CSF durch Stromazellen und Fibroblasten wird durch den Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin 1 (IL-1) reguliert (Kitazawa et al., 1994; Koreny et al., 2006). Die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1, die von einer Reihe von Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten produziert werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Knochenosteolysen (Kobayashi et al., 2000). Sie unterstützen die Differenzierung von Osteoklasten und hemmen die Osteoblastenaktivität durch Regulierung der RANK-L und Osteoprotegerin Expression in osteoblastären Zellen (Brandstrom et al., 1998; Hofbauer et al., 1999; Lam et al., 2000). TNF α kann unabhängig von RANK-L die Osteoklastendifferenzierung aus osteoklastären Vorläuferzellen unter Anwesenheit von M-CSF direkt stimulieren (Azuma et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Kudo et al., 2002). Außerdem ist TNF α auch an der Regulation der RANK Expression in Makrophagen beteiligt (Kitaura et al., 2013; Quinn et al., 2000).

Osteoprotegerin (OPG), ein zweiter löslicher Rezeptor an den RANK-L binden kann, ist gleichzeitig Gegenspieler von RANK-L. OPG hemmt die durch RANK-L stimulierte Osteoklastendifferenzierung (Crotti et al., 2004; Grimaud et al., 2003; Sabokbar et al., 2003). OPG kann das lösliche RANK-L binden und es damit neutralisieren (Gallo et al., 2014). Die Balance zwischen OPG und RANK-L ist wichtig für den Knochenhaushalt, indem es die Aktivität von RANK in den Osteoklasten reguliert (Boyle et al., 2003; Granchi et al., 2005). Die RANK/RANK-L Interaktion, stimuliert auch die Expression von zahlreichen osteoklastären Markern wie tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) und Cathepsin K (Costa-Rodrigues et al., 2010).

1.1.2. Osteoblastäre Komponente

Kollagen Typ I ist mit ungefähr 90% die am weitesten verbreitete Kollagenart im menschlichen Körper. Es ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix des Bindegewebes in Sehnen, Bändern, Haut und Kornea aber vor allem auch im Knochen (Kim et al., 2014; Kwansa et al., 2014; Mushahary et al., 2014). Kollagen Typ I hat eine quervernetzte Tripelhelixstruktur, die bei der Belastbarkeit des Knochens und Gelenkknorpels mitwirkt. Es dient auch als Grundgerüst für Zellen und anderer Bestandteile des Extrazellulärraums wie Fibronectin oder Proteoglykane (Kwansa et al., 2014).

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die von mesenchymalen Zellen des Knochenmarks abstammen (Gallo et al., 2008). Sie bilden die extrazelluläre Matrix des Knochens, das Osteoid, welches noch nicht mineralisiert ist und vor allem aus Kollagen Typ I besteht. Außerdem produzieren ausgebildete Osteoblasten alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin, die als Marker für die Osteoblastenaktivität verwendet werden können (Przekora and Ginalska, 2015). ALP findet sich in der Zellmembran der Zellen. Die genaue Funktion des Enzyms ist nicht bekannt aber es wird angenommen, dass es dem Transport von Signalstoffen von intrazellulär nach extrazellulär beteiligt ist (Christenson, 1997).

1.1.3. Proteasen

Nicht nur durch verminderte Matrixproduktion sondern auch durch eine erhöhte Proteasenaktivität kommt es zu einer Minderung der Extrazellulärmatrix. Im PPG lässt sich eine große Menge an Matrix Metalloproteinasen (MMPs) nachweisen (Takei et al., 2000). Die MMPs werden mit Degeneration der Matrix in Zusammenhang gebracht (Everts et al., 1998; Wagner et al., 2008). Die MMPs können Bestandteile der Extrazellulärmatrix spalten (Stamenkovic, 2003). Außerdem sind MMPs wichtig für die Migration von Osteoklasten durch Kollagen (Sato et al., 1998). Der Einfluss von MMPs auf die Matrixdegeneration konnte durch Untersuchungen mit MMP Inhibitoren (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMPs) bekräftigt werden. Durch den Einsatz von TIMPs konnte die Kollagendestruktion in den Resorptionslakunen des Knochens reduziert werden (Everts et al., 1998). Außerdem zeigte sich durch

den Einsatz von TIMPs, dass MMPs vermutlich zu einem späteren Zeitpunkt bei Osteolysen aktiv sind als Zysteinproteinasen wie Cathepsin K (Delaisse et al., 2003). MMP-13, das auch im neutralen pH Wert aktiv ist, wird von periprothetischen Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert und kann als aktives Enzym Kollagen I, II und III abbauen (Ma et al., 2006; Takei et al., 2000; Wagner et al., 2008). MMP-13 wird als Proenzym synthetisiert und nach dessen Aktivierung spaltet es die ⁷⁷⁵Gly-⁷⁷⁶Ile (Leu) Peptidbindung im Kollagen (Ma et al., 2006). Im PPG wird eine deutlich erhöhte Konzentration von MMP-13 gefunden wohingegen in der Synovialis fast kein MMP-13 detektiert wird (Diehl et al., 2004; Takei et al., 2000). Man geht davon aus, dass MMP-13 eine wichtige Rolle bei der aseptischen Endoprothesenlockerung spielt.

1.1.4. Endotoxin

Mehrere Studien beschäftigen sich mit der biologischen Reaktion, des auf Partikel anhaftenden Endotoxins (Cho et al., 2002; Ragab et al., 1999). Obwohl die aseptische Lockerung von fehlenden klinischen und mikrobiologischen Infektionszeichen ausgeht, schließt es den Einfluss von subklinischen Bakterienleveln nicht aus (Bi et al., 2001; Greenfield et al., 2005). Lipopolysaccharid (LPS) ist das klassische Endotoxin (Nalepka et al., 2006), welches von Gram negativen Bakterien produziert wird und das Immunsystem aktiviert (Greenfield et al., 2005; Nalepka and Greenfield, 2004).

Titan und Titanlegierungen zeigen eine hohe Affinität zu Endotoxin (Lieder et al., 2013). Hinweise häufen sich, dass anhaftendes Endotoxin zur aseptischen Endoprothesenlockerung beitragen kann (Beidelschies et al., 2008). Anhand eines Schädelkalottenmodells zeigte sich, dass Endotoxin-beladene Titanpartikel 50% mehr Osteolysen *in vivo* induzieren als Endotoxin freie Partikel (Greenfield et al., 2005; Lieder et al., 2013).

Endotoxin stimuliert die Ausschüttung von Prostaglandinen und Zytokinen (Ragab et al., 1999). Durch die Zugabe von Endotoxin-beladenen Titanpartikeln kommt es *in vitro* zu einer vermehrten Produktion von TNF α und IL-6 (Bi et al., 2001; Greenfield et al., 2005). Hingegen stimulieren endotoxinfreie Partikel nur eine geringe Produktion dieser Zytokine (Cho et al., 2002). Beide Zytokine stimulieren so-

wohl die Differenzierung von Präosteoklasten zu Osteoklasten als auch die Knochenresorption (Greenfield et al., 2005).

Es gibt unterschiedliche Gründe dafür, dass Endotoxin im PPG zu finden ist. Ursachen dafür können ein bakterieller Biofilm auf der Prothese oder zirkulierendes Endotoxin sein, das sich an die Abriebpartikel heftet. Auch die Kontamination bei der Herstellung der Prothese könnte eine Quelle für Endotoxin sein (Beidelschies et al., 2008; Lieder et al., 2013).

1.1.5. Periprothetische Fibroblasten-artige Zellen

Das PPG besteht aus multinukleären Riesenzellen, 10% Lymphozyten, 20% Makrophagen und zu 70% aus periprothetischen Fibroblasten-artigen Zellen (PPFs) (Goldring et al., 1983; Perry et al., 1995; Tsutsumi et al., 2009).

Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs, welche abhängig von ihrer Lokalisation verschiedene Funktionen besitzen. Eine wichtige Funktion ist die Bildung von extrazellulärer Matrix, um dem Gewebe seine mechanische Festigkeit zu geben (Aidinis et al., 2003; Costa-Rodrigues and Fernandes, 2011). Makrophagen stellen zwar Schlüsselzellen periprothetischer Osteolysen dar (Goodman et al., 1998), dennoch zeigt sich, dass auch andere Zellarten wie Osteoblasten, durch gestörte Kollagen Typ I Produktion (Vermes et al., 2001; Yao et al., 1997) sowie aktivierte Fibroblasten (Yao et al., 1995) Anteil an der Dysregulation des Knochenstoffwechsels haben und schlussendlich zur Endoprothesenlockerung führen (Tunyogi-Csapo et al., 2007). Der Einfluss von Fibroblasten im PPG wird seit längerer Zeit vermehrt untersucht. Wichtige Signalstoffe, welche ossäre Osteolysen fördern werden durch PPFs gebildet (Tunyogi-Csapo et al., 2007; Wei et al., 2009; Yao et al., 1995). PPFs exprimieren das proinflammatorische Zytokin TNF α (Quinn et al., 2000). Durch Zugabe von M-CSF können die PPFs eine vermehrte Osteoklastenbildung fördern und dadurch zur Endoprothesenlockerung beitragen (Sabokbar et al., 2003).

Fibroblasten können *in vivo* und *in vitro* Partikel phagozytieren (Koreny et al., 2006). Nach Stimulation mit Titanium Partikeln zeigt sich, dass PPFs proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-1 und M-CSF, die für die Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten wichtig sind, vermehrt exprimieren (Costa-Rodrigues and Fernandes, 2011; Koreny et al., 2006; Qian et al., 2008). Auch zeigen die PPFs nach

Stimulation mit Titaniumpartikeln eine vermehrte Expression von Cyclooxygenase 2 (COX-2) und RANK-L (Bukata et al., 2004; Tunyogi-Csapo et al., 2007).

Prostaglandin E2 (PGE2), ein Signalprotein der Knochenresorption wurde im PPG detektiert (Jiranek et al., 1993). PGE2 wird durch die COX-2, die von Fibroblasten exprimiert wird, produziert. PGE2 kann durch Bindung an den EP4 Rezeptor auf den Fibroblasten, die Expression von RANKL erhöhen (Tsutsumi et al., 2009).

COX-2 defiziente oder mit COX-2 Inhibitoren behandelte Mäuse zeigen nach Stimulation mit Titaniumpartikeln keine Osteolysen. Die Ursache könnte die fehlende Hochregulierung von RANK-L durch PGE2 sein (Tsutsumi et al., 2009).

Die RANK-L exprimierenden PPFs können unter Anwesenheit von M-CSF zur Differenzierung der Osteoklasten aus osteoklastären Vorläuferzellen beitragen, indem sie an den RANK-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen oder osteoklastären Vorläuferzellen binden (Purdue et al., 2006).

Auch der Gegenspieler von RANK-L OPG wird nach Stimulation mit Titaniumpartikeln oder TNF α vermehrt in den PPFs exprimiert (Tunyogi-Csapo et al., 2007). OPG verhindert die Interaktion von RANK-L mit dem Rezeptor RANK und dadurch die Ausreifung der Osteoklasten (Veigl et al., 2007). PPFs können demnach die periprotetische Osteolysen fördern und hemmen.

Außerdem kommt es in PPFs nach Stimulation mit Titaniumpartikeln zu einer vermehrte Expression von Matrix-Metalloproteinasen und Kollagenasen (Koreny et al., 2006). Das synthetisierte MMP-13 wird anschließend in die Resorptionszone transportiert und kann dort bei dem Matrixabbau mithelfen (Delaisse et al., 2003). Es ist auch belegt, dass es in PPFs nach Calcitriol Zugabe, ein Steroidhormon welches am Calcium Haushalt beteiligt ist (Takahashi et al., 2014), zu einer vermehrten Cathepsin K Expression kommt (Mandelin et al., 2005). Zusammen mit MMP13 führt Cathepsin K zu einer Kollagen Destruktion im PPG (Wagner et al., 2008).

Es zeigte sich, dass nach Stimulation mit Titaniumpartikeln oder Zytokinen PPFs aktiviert werden können und dadurch an der Endoprothesenlockerung teilhaben. In unserer Arbeit haben wir das Expressionsverhalten unstimulierter PPFs untersucht.

1.1.6. Dreidimensionale Kulturen

Es ist bekannt, dass Zellen sich ihrer Umgebung anpassen und auf deren Signale reagieren. Das wiederum hat Konsequenzen für die Zellproliferation, Differenzierung und Funktion (Baker and Chen, 2012). Die Kultivierung im zweidimensionalen System (2D) hat eine Abflachung sowie eine Umgestaltung der Zelle und des inneren Zytoskeletts zur Folge (Vergani et al., 2004). Dies zeigte sich in der Veränderung der Genexpression und der Proteinsynthese (Yao et al., 2002). Dreidimensionale Kulturen (3D) wurden entwickelt um die Zellstrukturen zu verbessern. Die dritte Dimension ermöglicht einen verbesserten Zell zu Zell Kontakt, der durch eine Zunahme der intrazellulären Signalwege, den Wachstumsprozess fördert und der es den Zellen ermöglicht, in komplexere Strukturen zu differenzieren. Die 3D Zellkultur stellt ein gutes Mikroenvironment für das Zellwachstum, die Differenzierung und Funktion dar. *In vitro* zeigt das 3D System die Fähigkeit gewebeähnliche Strukturen herzustellen (Knight and Przyborski, 2014; Yao et al., 2002).

Es gibt zwei unterschiedliche Ansätze der 3D Kulturen, Scaffolds und Scaffold-freie Kultursysteme. Scaffold Kultursysteme können entweder aus synthetisierten oder aus natürlichen Materialien bestehen. Natürliche Scaffolds können aus Protein (Kollagen (Baharvand et al., 2006), Fibrin (Im et al., 2005), Seide (Altman et al., 2002)) und Polysaccharid (Agarose (Awad et al., 2004), Alginat (Gerecht-Nir et al., 2004) und Hyaluronsäure (Gerecht et al., 2007)) basierenden sowie weiteren Biomaterialien hergestellt sein. Die synthetisch hergestellten Scaffolds haben den Vorteil, dass die chemische Zusammensetzung definiert ist und die mechanischen Eigenschaften einstellbar sind, welche die Zellanheftung und Differenzierung beeinflussen können. Für synthetische Scaffolds können Polymer, Peptid (Hosseinkhani et al., 2006) oder Keramik basierende Materialien verwendet werden. Nachteile können einerseits die durch biologische Materialien ausgelösten Immunreaktionen sowie andererseits die fehlenden Zell-Scaffold Interaktion bei synthetische Polymeren (Chung and Burdick, 2008) sein. Insgesamt stellen Scaffold-freie Kultursysteme einen guten Ansatz zur Kultivierung von Zellen und Organoiden dar.

1.1.7. Scaffold-freie Transwellmembran Kulturen

Als Alternative zum Scaffold entwickelte Trowell et al. ein Modell um *in vitro* Gewebestücke von 1-2 mm² kultivieren zu können (Trowell, 1954). Grundlage war hier, dass das Gewebe am Übergang zwischen Medium und Gasphase kultiviert wurde. Durch den Kontakt zur Gasphase bekam das Gewebestück genug Sauerstoff und durch den Kontakt mit dem Medium ausreichend Nährstoffe. Nachteil dieser Methode war, dass durch den langsamen Sauerstoff Austausch, die Versorgung der inneren Gewebestückes nicht immer gewährleistet war (Trowell, 1954).

Für das PPG wurden Organkulturen verwendet um die osteolytische Aktivität des Gewebes zu untersuchen (Goldring et al., 1983). Für unsere Arbeit haben wir das Organkultur Modell modifiziert. Ein Transwellssystem wurde zur Etablierung einer Scaffold freien dreidimensionalen Kultur verwendet. Hier können Zellen auf einer Polycarbonat Membran kultiviert werden und erhalten ihr Nährmedium nicht nur von einer Seite, wie bei den modifizierten Organkulturen, sondern sind von beiden Seiten mit Nährmedium umgeben (Sabater et al., 2013).

Ursprünglich wurde die Transwellkultur für Co-Kulturen verwendet. Unterschiedliche Zellarten können sich hier das gleiche Medium teilen, während sie jedoch keinen direkten Zellkontakt haben (Alcantara et al., 2011; Bloemen et al., 2010; Liu et al., 2013; Sabater et al., 2013). Dadurch kann untersucht werden, ob der direkte Zellkontakt zur Differenzierung von Zellen notwendig ist oder nur die durch Zellen freigesetzten Mediatoren.

2. Fragestellung

Die Ursache der aseptischen Endoprothesenlockerung ist multifaktoriell. Die periprotetischen Fibroblasten-artigen Zellen stellen mit 70%, die am häufigsten vorkommende Zellart in der periprotetischen Membran dar. Deshalb wurde in letzter Zeit der Einfluss von periprotetischen Fibroblasten auf die Endoprothesenlockerung vermehrt untersucht. Ziel dieser Studie war es

1. Das periprotetische Gewebe auf knochenumbauregulierende Marker zu untersuchen und ihre Rolle bei der aseptischen Endoprothesenlockerung zu beschreiben.
2. Das Expressionsverhalten von periprotetischen und synovialen Fibroblasten-ähnlichen Zellen in verschiedenen (2D und 3D) Kultursystemen zu analysieren.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Analysewaage	Sartorius, D
Autoclav	H+P Labortechnik, D
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Binder, D
Certomat Moll	Sartorius, D
Elektrische Pipettierhilfe, accu-jet-pro	Brand, D
Elektrophluoresenzgerät PS 304	Whatman, D
Elektrophoresekammer Typ Horizon 11.14	Whatman, D
Entwässerungsmaschine Hypercenter XP	Shandon GmbH, D
Gefrierschränke -20°C	Bosch, D
Gefrierschränke -80°C	Heraeus, D
Glasgondel	Carl Roth, D
Gourmetkocher	Braun, D
Heizplatte	Medax, D
Kamerasystem Axio Cam MRc 5	Zeiss, D
Kryo-Thermogefäß	Thermo Scientific, D
Kryotom, Modell CM 3050	Leica, D
Kühlschränke +4°C	Liebherr, CH
Küvetten 200mL	Carl Roth, D
Lichtmikroskop, Modell Axioskop 40	Zeiss, D

Material und Methoden

Light Cycler® 96 Real-Time PCR System	Roche Diagnostik, D
Megaforce 2,0 mit Einsätzen für Wells	Heraeus, D
Mikro-Dismembrator S	Sartorius, D
Mikroskop Zellkultur Axiovert 40 CFL	Zeiss, D
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, USA
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht Assistent, D
Paraffinmikrotom Jung Biocot 2035	Leica, D
Paraffingießmaschine EG 1160	Leica, D
pH Meter HI 122	Hanna Instruments, D
Pipettierhilfe Pipetman Neo., 0,2-2µl, 1-10µl, 2-20µl, 20-100µl, 50-200µl, 100-1000µl	Gilson, USA
Reinraumwerkbank, HeraSafe	Heraeus, D
Stickstofftank	Cryotherm, D
Thermo-Cycler T100	Bio-Rad Laboratories, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, D
Tisch-Rundschüttler Certomat MO II	Sartorius, D
Trockenschrank	Binder, D
Vortexer	Bender&Hobein AG, CH
Wärme- und Heizplatte	Meday, D
Wasserbad	Heraeus, D
Zentrifuge Zellkultur Multifuge 1L-R	Eppendorf, D
Zentrifuge DNA/RNA-Arbeitsplatz 5417R	Heraeus, D

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Abdecktücher, steril, Secu-Drape	Sengewald, D
Alu Folie	Schubert & Weiss, Omnilab, D
Bacillof AF	Bode Chemie, D
Becherglas	Schott Duran, D
Carrier Plates for 24 Well with Polycarbonate Membrane and 0,4µm pore size	Nunc, DK
Chamber slides, 4Well, LabTekII	Nunc, DK
Cryomold Einbettförmchen Biopsie	Sakura, NL
Deckgläser	Menzel, D
Einbettkassetten Biopsie weiß	Resolab, D
Einfrier Röhrchen 1,0ml	Nunc, DK
Einwegpinzetten, steril	Seidel Medizin, D
Einwegskalpelle, steril	Feather Safety Razor, J
Erlenmeyer-Kolben	Schott Duran, D
Färbekästen	Simport, CDN
Faltenfilter, qualitativ Größe 185mm	Roth, D
Filtereinheit, gebrauchsfertig 0,2µm	Whatman, USA
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	Air Liquide, D
Gesichtsmasken	Mölnlycke Health Care, SE
Gigasept R AF	Schülke & Mayr, D
Kryo-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, USA

Material und Methoden

Laborhandschuhe, Puderfrei S	Lohmann & Rauscher, AT
Light cycler® 480 Multitwell Platte 96	Roche Diagnostik, D
Light cycler® 480 Sealing Foil	Roche Diagnostik, D
Microlane™3-Kanüle, 20G	BD, USA
Microtome Blade A35	Feather Safety Razor, J
Multidish 24	Nunc, NL
Nitrilhandschuhe , puderfrei S	Semper, D
Pipettenspitzen (0,2-2µl, 1-10µl, 2-20µl, 20-100µl, 50-200µl, 100-1000µl)	Gilson, USA
Objektträger Superfrost® plus	Menzel, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
PCR Test Röhrchen	G.Kisker, D
Petrischalen, steril 92mm	Nunc, D
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, D
RNAse Inaktivierungsspray	Ambion, D
Scheren	Carl Roth, D
Serumpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning incorporated, USA
Spritzen 10ml	BD, USA
Stahlkugeln, 9mm	Sartorius, D
Tissue Tek	Sakura, NL
Wägebapier 9x11,5cm	Macherey Nagel, D
Zellfilter 70µm	BD, USA

Zellkulturflaschen, T75	Nunc, NL
Zentrifugenröhrchen 15ml	TPP, CH
Zentrifugenröhrchen 50ml	BD, USA

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, D
Aceton	Merck, D
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen, D
Chlororform	Sigma-Aldrich, D
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, D
Ethanol 40%, 70%, 96% und 100%je in aqua dest.	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Ethanol absolut	Merck, D
LAL-Reagent Wasser	Lonza, CH
Na-Acetatpuffer 0,1M pH 5,5	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Natriumhydroxid Tabletten	Merck, D
Nuclease-Free-Water	Ambion, D
Paraformaldehyd	Merck, D
Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Rotihistol	Roth, D
Salzsäure	Merck, D

Quiazol Lysis Reagent	Quiagen, D
Trypan Blau 0,5%	Biochrom, D

3.1.4. Zellkultur

α -MEM	Biochrom, D
Amphotericin B Lsg. 250 μ g/ml	Sigma-Aldrich, D
Collagenase from Clostridium 0,2%	Sigma-Aldrich, D
Dulbecco´s MEM	Biochrom, D
DMSO	Merck, D
Erylyse Puffer pH 7,4	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt D
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, AT
L-Glutamin 200mM	Biochrom, D
PBS-Puffer Zellkultur, pH 7,4	Biochrom, D
Penicillin/Streptomycin 10000 IU/ml/10000 μ g/ml	Biochrom, D
Trypsin/EDTA Lsg. 10x	Biochrom, D
Versene	Invitrogen, D

3.1.5. Histologie und Immunhistochemie

3.1.5.1. Farben und Reagenzien

ABC-Kit	Vector Laboratories, USA
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, D
AK-Verdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik, D
Aquatex	Merck, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, D
Brij	Sigma-Aldrich, D
Citrat-Puffer pH6	DCS Innovative Diagnostik, D
DAB Substrat Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, USA
DPX Mountain	Sigma-Aldrich, D
EDTA Puffer pH8	DCS Innovative Diagnostik, D
Eosin Y Solution	Sigma-Aldrich, D
Hämalaun nach Meyer Lsg.	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, D
Proteinase XXIV	Sigma-Aldrich, D
Super Vision RED2AP-Polymer Kit	DCS Innovative Diagnostik, D
Target Retrieval Solution pH6	Dako, D
Toluidinblau	Waldeck GmbH, D
TRAP-Kit	Sigma Chemical Co., USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck, D

3.1.5.2. Antikörper und Seren

Anti-CD68 PG-M1 aus der Maus, Monoclonal	Dako, D
Anti-S100A4 aus dem Kaninchen, Polyclonal	Abcam, UK
Biotin Anti-Maus aus dem Pferd	Vector Laboratories, USA
Biotin Anti Kanninchen aus der Ziege	Vector Laboratories, USA
ABO-Serum	Biotest, D
Pferdeserum	Vector Laboratories, USA
Ziegenserum	Dako, D

3.1.6. Polymerase-Change-Reaction (PCR)

6x Loading Dye Lsg.	Fermentas, D
Agarose	Invitrogen, D
DNA-Leiter GeneRuler 100bp	Fermentas, D
DNase-Kit	Quiagen, D
dNTP Set	Fermentas, D
Ethidiumbromid Lsg. 10mg/mL	BioRad Laboratories, D
FastStart Essential DNA Green Master	Roche Diagnostics, D
PeqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, D
QuantiTect® Rev. Transcription Kit	Quiagen, D
RNeasy® Mini Kit	Quiagen, D
TAE Puffer 10x	Invitrogen, D

Tag polymerase mit Puffer	Fermentas, D
---------------------------	--------------

3.1.7. Primer

Alle Primer für die quantitative PCR wurden bei der Firma Metabion, Martinsried, Deutschland erworben.

Primer	Sequenzen (5´-3´)	Paper
ALP	TCAAGGGTCAGCTCCACCACA ATTGGCCTTCACCCACACA	(Cordonnier et al., 2010)
Kollagen Typ I	GCTTCCCTGGTCTTCCTG TCTCACCACGGTCACCCT	(Varas et al., 2007)
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC GGCATGGACTGTGGTCATGAG	(Vandesompele et al., 2002)
Cathepsin K	TTCCCGCAGTAATGACACC TTTCCCCAGTTTCTCCCC	(Granchi et al., 2005)
M-CSF	CCGAGGAGGTGTCGGAGTAC AATTTGGCACGAGGTCTCCAT	(Bloemen et al., 2010)
MMP 13	GACTTCACGATGGCATTGCTG GCATCAACCTGCTGAGGATGC	(Hong et al., 2009)
OPG	CTGCGCGCTCGTGTTTC ACAGCTGATGAGAGGTTTCTTCGT	(Bloemen et al., 2010)
RANK	CCTGGACCAACTGTACCTTCCT ACCGCATCGGATTTCTCTGT	(Bloemen et al., 2010)
RANK-L	CATCCCATCTGGTTCCCATAA GCCCAACCCCGATCATG	(Bloemen et al., 2010)
TNF α	CCCAGGGACCTCTCTAATC GCTTGAGGGTTTGCTACAACATG	(Bloemen et al., 2010)
TRAP	TAGCCGGAAACCATGACCACC GATGCCACGCCATTCTCATC	(Granchi et al., 2005)

3.1.8. Software

AxioVision, Rel. 4.5
EndNote X5
IrfanView, V 4.40
LightCycler [®] 96 SW 1.1
Microsoft Office mac 2011 (Excel, Word)
Prism, V 3.0
Zoner Draw, V 3.0

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Allgemeine Bemerkungen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an einer Reinraumwerkbank (Klasse II) durchgeführt. Medien und Medienzusätze wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂- Atmosphäre in Raumluft sowie 95% Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde, wenn nicht anders beschrieben, zweimal pro Woche gewechselt. Zellsuspensionen wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 1500 rpm, Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert.

3.2.1.2. Einfrieren von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen nach dem Trypsinieren gezählt, mit $2,5 \times 10^5$ oder 5×10^5 Zellen pro 1,5 ml Einfriermedium (Tabelle 3.1) resuspendiert und bei -80°C weggefroren. Bei längerer Liegedauer der Zellen wurden diese zur Aufbewahrung in Stickstoff überführt.

Zellart	Medium (%)	FCS (%)	DMSO (%)
Isolierte Zellen	Fibroblastenmedium 70%	20%	10%

Tab. 3.1 Einfriermedium

3.2.1.3. Auftauen der Zellen

Zellen die entweder bei -80°C oder in Stickstoff weggefroren waren, wurden in der Hand erwärmt. Nachdem die Zellen verflüssigt waren wurden diese in 5 ml Waschmedium aufgenommen, für 10 Minuten stehen gelassen, danach abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Anschließend wurden die Zellen wieder in 2 ml

des entsprechenden Mediums resuspendiert, gezählt und jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen pro T75 Flasche ausgesät.

3.2.1.4. Passagieren der Zellen

Zellen in Monokulturen wurden bei einer Dichte von 90% gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um eine Inaktivierung des Trypsins zu verhindern.

Im Anschluss daran wurden die Zellen mit einfacher Trypsin-EDTA Lösung (0.05% / 0,02%) in PBS 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung der Zellen wurde FCS haltiges Medium hinzugegeben um den Verdau zu stoppen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und darin zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde gezählt. Die Zellen wurden entweder kryokonserviert, in der nächsten Passage kultiviert oder für Polylayer Versuche verwendet.

3.2.1.5. Zählen der Zellen

Die Anzahl der Zellen in einer Zellsuspension wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte durch die Trypanblaufärbung. Bei toten Zellen kann der Farbstoff die Membran durchdringen, bei vitalen Zellen hingegen nicht. Dadurch heben sich vitale Zellen von dem blauen Hintergrund ab und können gezählt werden. Das Verhältnis von Trypanblau und Zellsuspension betrug 1:1, jeweils 10 µl.

Die Zellkonzentration kann anhand folgender Formel berechnet werden.

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{mL Zellsuspension}} = \frac{n(\text{Zellen gesamt})}{n(\text{ausgezählte Quadrate})} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.1.6. Zellgewinnung aus humanem Periimplantatgewebe und humanem Synovialgewebe

Humane Periimplantatgewebe werden in anonymisierter Form intraoperativ bei orthopädischen Endoprothesenwechseloperationen gewonnen. Zum Vergleich wird

humanes Synovialgewebe verwendet. Eine Unbedenklichkeitserklärung für die Probenasservierung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität liegt vor.

Alle Spender wurden vorher auf Hepatitis B und C sowie HIV getestet. Nur seronegative Spender wurden verwendet.

Die Isolierung von Fibroblasten aus humanem Periimplantatgewebe sowie humanem Synovialgewebe lief nach gleicher Methode ab.

Das gewonnene Gewebe wurde im Transportmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.2) vom Operationssaal in das Labor überführt und am gleichen Tage weiterverarbeitet.

Transportmedium	
Mediumzusätze	Konzentration
Dulbecco´s MEM	
Penicillin	60 IU /ml
Streptomycin	60 µg /ml
Amphotericin B	0,075 µg /ml

Tab. 3.2 Zusammensetzung Transportmedium

Danach wurde das überschüssige Transportmedium entfernt, das Gewebe in eine Petrischale überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Mit steriler Pinzette und Skalpell wurde ein 1-2 cm großes Gewebestück für die Histologie (3.2.2.1.) und ca. 10 x 1-2 mm große Stücke für die RNA-Isolierung gewonnen (3.2.3.2.).

Das restliche Gewebe wurde in 1-2 mm große Stücke geteilt und nochmals mit PBS gewaschen. Dieses Gewebe wurde anschließend für 15 Minuten in Waschmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.3) inkubiert und im Anschluss daran nochmals mit PBS gewaschen.

Waschmedium	
Mediumzusätze	Konzentration
Dulbecco´s MEM	
Penicillin	60 IU /ml
Streptomycin	60 µg /ml
Amphotericin B	0,25 µg /ml

Tab. 3.3 Zusammensetzung Waschmedium

Zur Isolierung der Zellen wurde das Gewebe in 0,1%iger Collagenase (10 ml Fibroblastenmedium + 10 ml Collagenase 0,2%) für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Der Überstand wurde über ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Danach wurde das Gewebe für 1 Stunde mit 20 ml Versene bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand wieder mehrmals über das Zellsieb pipettiert um das Gewebe von Knochen und Zement zu lösen. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die restlichen Erythrozyten zu lysieren wurden mit einer Spritze 10 ml Erylyse Puffer durch eine sterile gebrauchsfertige Filtereinheit (0,2 µm) gespritzt, mit den Zellen aufgeschüttelt und im Anschluss daran abzentrifugiert. Die Zellen wurden im Medium für isolierte Zellen resuspendiert, gezählt und ca. $2,5 \times 10^5$ Zellen pro T75 Zellkulturflasche in Passage 0 ausgesät.

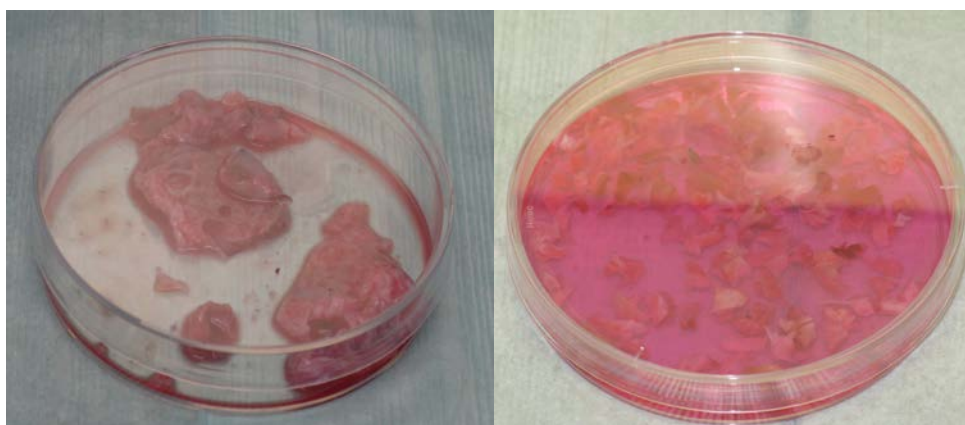


Abb. 3.1 Aufarbeitung des Gewebe

3.2.1.7. Kultivierung

Die Fibroblasten-ähnlichen Zellen wurden für die Kultivierung in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 Fibroblasten-ähnliche Zellen des Synovialgewebes (SFs) im Monolayer, Gruppe 2 SFs im Transwellsystem, Gruppe 3 periprothetische-Fibroblasten-ähnliche Zellen (PPFs) im Monolayer und Gruppe 4 PPFs im Transwellsystem und jeweils für 10 und 21 Tage kultiviert.

3.2.1.7.1. Monolayer Kultivierung

Bevor die isolierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen des Periimplantatgewebes sowie des Synovialgewebes in das dreidimensionale Kultursystem überführt wurden, wurden diese von Passage 0 bis Passage 3 im Monolayer zur Expandierung der Zellzahl kultiviert. Die isolierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen wurden in jeder Passage mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen kultiviert.

In Passage 4 wurden 2 Flaschen à 4×10^5 Zellen ausplattiert und für oben genannte Zeiträume kultiviert.

Das Kulturmedium der isolierten Zellen für Monolayer- und Transwellsystem ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Kultur Medium für isolierte Fibroblasten-ähnliche Zellen	
Mediumzusätze	Konzentration
α-MEM	
Fetales Kälberserum	10%
Penicillin	60 IU /ml
Streptomycin	60 µg /ml
L-Glutamin	2 mM
Amphotericin- B	0,025 µg /ml

Tab. 3.4 Zusammensetzung Medium für isolierte Fibroblasten-ähnliche Zellen

3.2.1.7.2. Dreidimensionales Kultursystem

Als dreidimensionales Kultursystem wurde ein Transwellsystem nach dem Protokoll nach Murdoch (Murdoch et al., 2007) verwendet. Das verwendete Transwellsystem für eine 24 Well Platte besteht aus einer Polycarbonat Membran mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$. Die Membranen konnten in drei unterschiedlichen Höhen in das Hängesystem eingehängt werden. In den Versuchen wurde stets die mittlere Position benutzt.

Nach dem trypsinieren und abzentrifugieren wurden die Zellen gezählt. Ein Zellpool mit $2,4 \times 10^6$ Zellen wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 3 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Jeweils 500 μl , entsprechen 4×10^5 Zellen, wurden auf eine Membran pipettiert und bei 600rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde in die untere Kammer des Well Systems 700 μl des entsprechenden Mediums gegeben und in den Brutschrank gestellt. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.2.1.7.3. 24 Well Kultivierung

Für die Versuche mit isolierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus dem Periimplantatgewebe und Synovialgewebe wurden neben Monolayer und Polylyer auch Zellen im 24 Well kultiviert. Nach dem trypsinieren, abzentrifugieren und zählen der Zellen wurden pro Well $1,2 \times 10^5$ Zellen in ein 15 ml Falcon überführt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 500 μl Medium pro $1,2 \times 10^5$ Zellen resuspendiert und jedes Well mit 500 μl der Zellsuspension befüllt. Die Zellen wurden im Brutschrank kultiviert und der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.2.1.7.4. Versuchsdurchführung

Nach der 3. Passage wurden die Zellen sowohl in ein Monolayer- (3.2.1.7.1.) als auch in ein Transwell-Kultursystem (3.2.1.7.2.) für die nächste Passage überführt und für 10 und 21 Tage kultiviert. Außerdem wurden in einzelnen Versuchen pro Zellreihe 24 Well Platten (3.2.1.7.3.) angelegt und diese für 1, 10 und 21 Tage kul-

tiviert. In der 24 Well Platte wurde an den genannten Tagen eine TRAP-Färbung durchgeführt (3.2.2.5.2.). Der Mediumwechsel erfolgte nach der jeweiligen Kultivierungsart.

Ebenso erfolgte die Entnahme eines Zellpools zur RNA-Isolierung (3.2.3.1.).

Für die Auswertung wurden 2 Membranen gepoolt und für die RNA-Isolierung verwendet. Eine Membran wurde für die histologische und immunhistologische Auswertung verwendet. Aus den Monokulturen wurde jeweils RNA-isoliert.

3.2.2. Histologie und Immunhistochemie

3.2.2.1. Einbettung des Primärgewebes

Das gewonnene Primärgewebe wurde wie in 3.2.1.6. beschrieben gewonnen. Das gewonnene Gewebestück wurde nach dreimaligen waschen mit PBS in ein Falcon mit 4% Paraformaldehyd (4% PFA) gegeben und für 24h bei 4°C im Kühlschrank fixiert. Nach 24h wurde das Gewebestück in 5 ml Entkalker überführt, wobei der Entkalker alle zwei Wochen gewechselt wurde. Regelmäßige Röntgenkontrollen wurden zur Überprüfung des Gewebestücks angefertigt. Nach vollständiger Entkalkung wurden die Gewebestücke in ein Einbettungsförmchen gegeben und für mindestens 4 Stunden unter laufendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht in den Entwässerungsautomaten gegeben. Durch die aufsteigende Alkoholreihe wurde dem Gewebe das Wasser und anschließend mit Hilfe von Rotihistol der Alkohol entzogen. Die Gewebestücke wurden im flüssigen Paraffin gelagert und am nächsten Tag gegossen.

3.2.2.2. Anfertigung von Paraffinschnitten

Um das Schneiden zu vereinfachen wurden die gegossenen Paraffinblöcke vor dem Schneiden mindestens 2h bei -20°C aufbewahrt. Die Blöcke wurden eingespannt und 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Sie wurden im Wasserbad gestreckt und auf *Superfrost® plus* Objektträger aufgezoogen, eine Nacht im Trockenschrank bei 50°C getrocknet und bei RT gelagert. Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte in einer Entparaffinierungsreihe entparaffiniert (2 x 10 Minuten Rotihistol, 2 x 10 Minuten 100% Ethanol, jeweils 5 Minuten 96% Ethanol und 70% Ethanol).

3.2.2.3. Einbettung der dreidimensionalen Kultursysteme

An Tag 10 oder 21 wurde das Medium von den Membranen entfernt und mit PBS gewaschen. Die Membranen wurden vorsichtig mit einem sterilen Skalpell (Größe 14) abgelöst und mit der Pinzette in Biopsie Formen überführt. Die Membranen wurden mit Tissue Tek bedeckt, in Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.4. Anfertigung von Gefrierschnitten

Von den Gewebemembranen wurden am Gefriermikrotom 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf *Superfrost® plus* Objektträger aufgezogen, 60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss daran mit kaltem Aceton 10 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden in Alufolie gewickelt und bei -20°C aufbewahrt. Vor Beginn der Färbungen wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.2.2.5. Histologie

3.2.2.5.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Vor dem Anfertigen von immunhistochemischen Färbungen wurde eine Übersichtsfärbung erstellt. Hämalun und Eosin wurden vor Gebrauch filtriert. Sowohl Kryo- als auch Paraffinschnitte wurden 5 Minuten in PBS 5 und anschließend 5 Minuten in Aqua Dest. rehydriert. Dann wurden die Schnitte 10 Minuten in Hämalun gefärbt und danach 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Im Anschluss daran erfolgte die 1 minütige Färbung mit Eosin und eine 5 minütige Spülung mit Aqua Dest. Die Schnitte wurden jeweils zweimal 5 Minuten in 100% Ethanol und Rothistol getränkt und danach mit Eukitt eingedeckt und 24h im Dunkeln getrocknet.

3.2.2.5.2. Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung

Zur Darstellung Tartrat resistenter saurer Phosphatasen in Osteoklasten wurde eine TRAP Färbung mit Hilfe des TRAP Kits von Sigma-Aldrich durchgeführt. Die Schnitte

wurden 5 Minuten in Aqua Dest. rehydriert. Danach wurden die Schnitte für 30 Sekunden bei RT in Citratlösung (2 ml Citratkonzentration aus dem Kit zu 18 ml Aqua Dest.) und 30 ml Aceton fixiert und 5 Minuten mit Aqua Dest. gespült. Anschließend wurden die Präparate 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zur Färbung wurde eine Küvette mit Alufolie umwickelt und die Färbelösung, bestehend aus 44 ml 37°C warmen Wasser, 2 ml Acetatlösung, 2 ml Naphtol-AS-BI-Phosphorsäure, 2 ml Tartratlösung und einer Fast Garnet GBC-Kapsel, filtriert und auf 37°C erwärmt. Die Präparate wurden für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln gefärbt und anschließend 5 Minuten mit Aqua Dest. gewaschen. Zum anfärben der Zellkerne wurden die Präparate 1 Minute mit Hämalaun gefärbt und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Alle Schnitte wurden mit Aquatex eingedeckt und bei Raumtemperatur 24h im Dunkeln getrocknet.

3.2.2.6. Immunhistochemie

3.2.2.6.1. CD68 Färbung

Paraffinschnitte wurden in 0,1% Brij-PBS-Lösung rehydriert. Als nächster Schritt erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidase mit 0,1% Wasserstoffperoxid in Methanol und anschließend zweimal für 5 Minuten mit 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Daraufhin wurden alle Schnitte mit Proteinase XXIV 0,1% (1:10 verdünnt mit PBS) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und wieder zweimal für 5 Minuten mit 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden wurden die Schnitte für 60 Minuten mit ABO Serum gemischt mit Pferdeserum (jeweils 1:20 in PBS mit 3% Bovinem Serum Albumin) inkubiert. Danach folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper gegen CD68 Klon PG-M1 (1:100 mit Antikörper Verdünnungslösung) aus der Maus. Die negativ Kontrollen wurden nur mit AK-Verdünnungslösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation für 30 Minuten mit dem sekundären, biotynilierten Antikörper gegen Maus aus dem Pferd (1:100 mit AK-Verdünnungslösung). Danach wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wurde 30 Minuten vorher angesetzt. Dazu wurden in 1 ml PBS jeweils 1 Tropfen der ABC Kit Lösung A und B hinzugefügt. Bei diesem Komplex

bindet Avidin an Biotin. Der ABC-Komplex wurde für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal mit 0,1% Brij-PBS-Lösung für jeweils 5 Minuten gespült. Als Detektionssubstanz wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Dieses wurde kurz vorher wie folgt angesetzt: auf 5 ml Aqua Dest. kommen 2 Tropfen Puffer, 4 Tropfen DAB, 2 Tropfen H₂O₂ und für die schwarze Detektion 2 Tropfen Nickel Solution. Die Schnitte wurden 10 Minuten mit der Detektionssubstanz inkubiert und mit Aqua Dest. gestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 1 Minute in Hämalaun gestellt und anschließend mit Leitungswasser gebläut. Alle Schnitte wurden über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag nach 5 minütigem rehydrieren in Rotihistol mit DPX eingedeckt. Zum Trocknen wurden die Schnitte über Nacht im Dunkeln gelagert.

3.2.2.6.2. S100A4 und Doppelfärbung CD68/S100A4

Die Färbungen für S100A4 und CD68/S100A4 Doppelfärbung wurden parallel gefärbt. Paraffinschnitte wurden für 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung rehydriert. Um das Gewebe für die S100A4 und CD68/S100A4 Doppelfärbung zugänglich zu machen, wurden die Paraffinschnitte für 25 Minuten in einem Citrat Puffer pH6 im Dampfgarer gekocht. Anschließend wurden die Schnitte 20 Minuten im Puffer stehen gelassen und zweimal für 5 Minuten mit 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Bei Gefrierschnitten konnte diese Methodik weggelassen werden.

Im nun folgenden Schritt wurden die Schnitte für die CD68/S100a4 Doppelfärbung 10 Minuten mit 0,1% Proteinase XXIV (1:10 mit PBS) inkubiert und zweimalig gewaschen. Darauf folgte für die Doppelfärbung die Blockade der endogenen Peroxidase für 10 Minuten mit 0,1% Wasserstoffperoxid in PBS. Danach wurde wieder zweimal 5 Minuten mit 0,1%Brij-PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurden alle Schnitte (S100A4 und Doppelfärbung) für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit AB0 Serum gemischt mit Pferdeserum (jeweils 1:20 in PBS mit 3% Bovinem Serum Albumin) inkubiert. Nun folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten mit dem primären Antikörper gegen S100A4 (1:100 mit Antikörper Verdünnungslösung) aus dem Kaninchen. Die negativ Kontrollen wurden nur mit AK-Verdünnungslösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde für 30 Minuten mit Enhancer (Anti-Maus, Anti-Kaninchen) inkubiert und wieder zweimal 5 Minuten in

0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Das Polymer-Reagenz mit alkalischer Phosphatase als Konjugat wurde für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben und wieder zweimal 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Als Detektionssubstanz wurde Fast Red verwendet. Die Reaktion wurde mit Aqua Dest. gestoppt. Für die Doppelfärbung wurden die Schnitte nun 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper gegen CD68 Klon PG-M1 (1:100 mit Antikörper Verdünnungslösung) aus der Maus. Die negativ Kontrollen wurden nur mit AK-Verdünnungslösung inkubiert.

Für die S100A4 Färbung wurden die Schnitte 1 Minute mit Hämalaun gegengefärbt und 5 Minuten unter Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden über Nacht Luftgetrocknet und am nächsten Tag nach 5 Minuten Rotihistol mit DPX eingedeckt.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte für die Doppelfärbung zweimal 5 Minuten in 0,1% Brij-PBS-Lösung gewaschen. Das weitere Protokoll entspricht dem zweiten Tag der CD68 Färbung (3.2.2.6.1.).

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1. RNA Isolierung aus dem Monolayer

Das Isolieren der Zellen erfolgte mittels RNeasy Mini Kit. Nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und zählen der Zellen wurden 4×10^5 Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 350 µl 2-Mercaptoethanol enthaltenen Lysis Puffer gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde die gleiche Menge an 70%Ethanol hinzugefügt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt.

Anschließend wurden 700 µl des Eluats auf die Silika Membran, maximale Bindungskapazität 100 µg, gegeben, bei 10000rpm 20 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauf folgten zwei Waschschrte mit jeweils 350 µl RW1 Puffer aus dem RNeasy Mini Kit. Die Lösungen wurden jeweils bei 10000rpm für 20 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss daran wurden 500 µl RPE Puffer auf die Membran gegeben, bei 10000rpm 20 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurden nochmals 500 µl RPE Puffer auf die Membran gegeben und bei 10000rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein

neues RNase freies Collection Tube gestellt und bei 14000rpm 1 Minute zum trock-trocknen der Membran zentrifugiert. Zur Eluation der RNA wurde die Membran in ein RNase freies Eppendorfgefäß gestellt, 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und bei 10000rpm 1 Minute zentrifugiert. Um eine höhere Ausbeute zu erzielen wurde der Durchfluss wieder auf die Membran pipettiert und nochmals für 1 Minute bei 10000rpm zentrifugiert. Die RNA Konzentration wurde mittels Nano-Drop, bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.3.2. RNA Isolierung aus dem Primärgewebe und dem dreidimensionalen Kultursystem

Für die RNA Isolierung aus dem Primärgewebe wurden Gewebestücke wie in 3.2.1.6. beschrieben gewonnen. Nach dreimaligem waschen mit PBS wurden ca. 10 x 1-2 mm großen Stücke auf Kryotubes verteilt und in Stickstoff schockgefroren. Für die RNA Isolierung aus dem dreidimensionalen Kultursystem wurden nach 10 und 21 Tagen jeweils das Medium von den Membranen entfernt und diese mit PBS gewaschen. Mit einem sterilen Skalpell (Größe 14) wurden die Membranen vorsichtig herausgeschnitten und jeweils 2 Membranen zusammen in ein Kryotube gegeben und in Stickstoff schockgefroren. Primärgewebe und Membranen konnten bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden.

Die Gewebestücke und Membranen wurden mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert. Dazu wurden Eisenkugeln mit einem Durchmesser von 9 mm mit 100% Ethanol desinfiziert. Kryotubes, Kugeln und Kryotube-Halter wurden in flüssigen Stickstoff gegeben. Jeweils eine Kugel wurde in ein Kryotube und anschließend nochmals in Stickstoff gegeben.

Nun wurden die Kryotubes in den Kryotube Halter gegeben und in den Dismembrator eingespannt. Die Proben wurden bei 3000rpm 1 Minute geschreddert, anschließend nochmals in Stickstoff gegeben. Dieser Schritt konnte wiederholt werden, falls das Gewebe noch nicht vollständig pulverisiert war.

Die Proben wurden 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Auf die pulverisierten Proben wurde jeweils 750 µl Quiazol Lysis Reagent gegeben und kurz gevortext. Die Kugeln wurden mit dem Stabmagnet entfernt. Die Quiazol-Lysate wurden nun in ein Eppendorfgefäß überführt, 200 µl Chloroform wurde hinzugefügt und das Ganze für

15 Sekunden gevortext. Die Proben wurden nun für 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 4°C und 10000rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Danach sollten sich drei Phasen gebildet haben. Die oberste Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Nun wurde die gleiche Menge an 70%Ethanol hinzugefügt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Die weiteren Schritte entsprechen dem Verfahren wie in 3.2.3.1. beschrieben.

Bei der RNA Isolierung aus dem Primärgewebe wurde ein DNase Verdau zwischen den beiden Waschschritten mit RW1 Puffer durchgeführt. Dazu wurde das DNase-Kit von Quiagen verwendet. Die DNase Stammlösung wurde wie im Kit beschrieben angesetzt. Pro Probe wurden 10 µl DNase- Stammlösung mit 70 µl RDD Buffer gemischt. Nach dem ersten Waschschriff mit 350 µl RW1 Puffer wurde pro Probe 80 µl DNase-Mischung direkt auf die Silika Membran pipettiert. Die DNase wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte der zweite Waschschriff mit RW1 Puffer. Die weiteren Schritte entsprechen dem Verfahren wie in 3.2.3.1. beschrieben.

3.2.3.3. cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Quiagen verwendet. Von allen Proben wurde immer 0,5 µg RNA umgeschrieben.

Die Proben wurden auf Eis gelagert und aufgetaut. Das entsprechende Volumen für 1 µg RNA wurde in ein PCR Tube pipettiert und auf 12 µl Gesamtvolumen mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Danach wurden 2 µl gDNA Wipeout Buffer 7x hinzugefügt. Um die genomische DNA zu eliminieren wurde das Ganze für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Währenddessen wurde der Master Mix vorbereitet. Die Zusammensetzung ist aus Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Reagenzien	1x
Quntiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Gesamt	6 µl

Tab. 3.5 Zusammensetzung Master Mix für cDNA Synthese

Für die cDNA Umschreibung wurde zu jeder probe 6 µl Master Mix hinzugefügt und erst für 15 Minuten bei 42°C und im Anschluss daran für weitere 3 Minuten bei 95°C inkubiert, um die Reverse Transcriptase zu inaktivieren.

Die entstandene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt oder gleich für die Qualitative Real Time PCR verwendet.

3.2.3.4. Quantitative Real Time PCR

Das Genexpressionsmuster der Proben wurde anhand der Real Time PCR ermittelt. Dabei wurde SybrGreen I als interkalierender Farbstoff verwendet. Bei jedem Zyklus steigt die Zahl an doppelsträngigen Produkten und proportional die Menge an Fluoreszenz. Zur Auswertung wurde der Crossing Point (CP) verwendet. Der CP-Wert beschreibt den Zyklus an dem die interkalierende Fluoreszenzmenge signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Am Ende der Real Time PCR findet eine Schmelzkurvenanalyse statt, um die Spezifität des Primers zu überprüfen.

Als interne Kontrolle wurde von jeder Probe das Housekeeping Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Die Crossing Points der zu untersuchenden Gene wurden mit dem Crossing Point des Housekeeping Genes normalisiert. Pro Probe fand die Auswertung im Triplet statt.

Die umgeschriebene cDNA der Proben wurden 1:3 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Dann wurde der Master Mix nach Tabelle 3.6 angesetzt. Für die Primer ALP, GAPDH, M-CSF, TNF α, OPG, RANK, RANK-L, MMP 13 wurde eine Primerkonzentration

on von 300nM verwendet. Für Kollagen Typ I, TRAP und Cathepsin K eine Konzentration von 500nM. Zu jedem Master Mix wurden 2,5 µl der Probe hinzugegeben und in die 96 Well Platte pipettiert. Zur negativ Kontrolle wurde RNase freies Wasser verwendet. Als positiv Kontrolle wurde spezifische cDNA (durch RT-PCR gewonnen, siehe unten) des jeweiligen Primers verwendet. Die 96 Well Platte wird bei 1500rpm für 1 Minute abzentrifugiert. Anschließend wird die Platte in das Light Cycler Gerät eingesetzt und bei dem jeweiligen Programm laufen gelassen.

Um die Effizienz der Primer zu bestimmen, wurde eine STD-Kurve für alle verwendeten Gene erstellt. Dazu wurde die cDNA der jeweiligen Primer aus einer PCR mit humanem Knochen mittels Peq-Lab Extraktionskit isoliert. Anschließend wurde die cDNA in 1 : 10 er Schritten verdünnt und amplifiziert.

Die Programme für die jeweiligen Primer sind Tabelle 3.7 bis 3.12 zu entnehmen.

Reagenz	300nM	500nM
H ₂ O	2,2 µl	2 µl
Primer 10µM forward	0,15 µl	0,25 µl
Primer 10µM reverse	0,15 µl	0,25 µl
DNA Green Master	5 µl	5 µl
Total Volume	7,5 µl	7,5 µl

Tab. 3.6 Zusammensetzung des Master Mix für die Real Time PCR

Schritt	Dauer (sec)	Steigung (°C/sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Denaturierung	600	20	95	1
	10	20	95	
Amplifikation	10	20	60	40
	15	20	72	
	10	20	95	
Schmelzkurvenanalyse	10	20	58	1
	0	0,1	95	
Kühlung	30	20	40	1

Tab. 3.7 Programm für GAPDH, M-CSF, RANK und RANK-L

Schritt	Dauer (sec)	Steigung (°C/sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Denaturierung	600	20	95	1
	10	20	95	
Amplifikation	10	20	63	40
	20	20	72	
	10	20	95	
Schmelzkurvenanalyse	10	20	58	1
	0	0,1	95	
Kühlung	30	20	40	1

Tab. 3.8 Programm für Cathepsin K

Schritt	Dauer (sec)	Steigung (°C/sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Denaturierung	600	20	95	1
	10	20	95	
Amplifikation	10	20	65	40
	15	20	72	
	10	20	95	
Schmelzkurvenanalyse	10	20	58	1
	0	0,1	95	
Kühlung	30	20	40	1

Tab. 3.9 Programm für Kollagen Typ I und TRAP

Schritt	Dauer (sec)	Steigung (°C/sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Denaturierung	600	20	95	1
	10	20	95	
Amplifikation	10	20	60	45
	30	20	72	
	10	20	95	
Schmelzkurvenanalyse	10	20	58	1
	0	0,1	95	
Kühlung	30	20	40	1

Tab. 3.10 Programm für ALP

Schritt	Dauer (sec)	Steigung (°C/sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Denaturierung	600	20	95	1
	10	20	95	
Amplifikation	60	20	60	40
	15	20	72	
	30	20	95	
Schmelzkurvenanalyse	10	20	58	1
	0	0,1	95	
Kühlung	30	20	40	1

Tab. 3.11 Programm für OPG und TNF α

Schritt	Dauer (sec)	Steigung (°C/sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Denaturierung	600	20	95	1
	10	20	95	
Amplifikation	10	20	62	40
	20	20	72	
	10	20	95	
Schmelzkurvenanalyse	10	20	58	1
	0	0,1	95	
Kühlung	30	20	40	1

Tab. 3.12 Programm für MMP-13

3.2.4. Endotoxin-Testung

Die Endotoxintestung wurde von der Firma Lonza in Belgien mittels des PyroGene™ Assay durchgeführt. Dieser Assay benutzt den rekombinanten Faktor C, welcher die Gerinnungskaskade in Gang setzt. Dafür wurde das Grundgewebe im Kryogefäß zweimal bei 3000rpm für jeweils 1 min geschreddert. Danach wurde das Gewebe 30 min auf Eis aufgetaut. 1 ml LAL-Reagent Wasser wurde zum lösen des geschredderten Materials hinzugefügt. Anschließend wurde das gelöste Material in ein neues Eppendorfggefäß überführt und bei RT 1h auf dem Schüttler geschüttelt. Danach wurde die Probe bei 600rcf für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 100°C für 10 min erhitzt, bevor es zu Testung eingeschickt wurde. Für den LAL-Assay wurden die Proben von Lonza mit 1:1 verdünnt. Das Detektionslimit der positiv Kontrolle (0,5 EU/ml) für den Endotoxin Assay liegt bei 0,005 EU/ml. Endotoxin Level die kleiner sind als 0,005 EU/ml liegen demnach unterhalb der Nachweisgrenze.

3.2.5. Statistik

Die Genexpressionsanalysen wurden im Triplikat angefertigt. Zur Auswertung der Proben wurde GraphPad Prism und Excel verwendet. In den Abbildungen werden der Median und die Interquartilsabstände (IQR) angegeben. Dabei wurden nach Art der Fragestellung unterschiedliche Verfahren angewandt. Zur Analyse der Untersuchungsgruppen (PPG vs SG, Monolayer- vs Transwellkultivierung sowie PPFs vs SFs) wurde der Man-Whitney U-Test verwendet. Für die Untersuchung von abhängigen Stichproben (zeitliche Verläufe von PPFs und SFs im Transwell/ Monolayerkultivierung) wurde der Wilcoxon-Paardifferenztest angewendet. Die histologischen Verteilungseigenschaften wurden mit dem exakten Fisher-Test durchgeführt.

Alle Tests erfolgten zweiseitig auf einem Alphaniveau von 0,05.

4. Ergebnisse

4.1. Periprothetisches Gewebe und Synovialgewebe

Periprothetisches Gewebe (PPG) wurde von 24 Patienten (m=9, w=15, 45-88 Jahre) bei Knie- (n=9, Totale Knieendoprothesenwechsel) oder Hüftrevisionsoperationen (n=15, 9 Pfannenwechsel, 2 Totale Hüftendoprothesenwechsel und 4 Schaftwechsel) gewonnen. Davon waren 10 Prothesen zementfrei (m=3, w=7, 51-88 Jahre) und 14 zementiert (m=6, w=8, 45-83 Jahre). Die durchschnittliche Standzeit der Endoprothesen betrug $8,44 \pm 7$ Jahre. Als Kontrollgewebe wurde Synovialgewebe (SG) von insgesamt 18 Patienten (m=9, w=9, 45-86 Jahre) gewonnen, die eine Hüftprothesenerstimplantation bekamen. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet, Serienschnitte wurden angefertigt und histologisch (HE und TRAP) sowie immunhistologisch (S100A4 sowie CD68) gefärbt. Die quantitative Expression der osteoklastogeneseregulierenden (RANK, RANK-L, OPG), osteoblastären (Kollagen Typ I, ALP) und osteoklastären Markern (TRAP, Cathepsin K) sowie des proteolytischen Enzyms MMP-13 und der Zytokine M-CSF und TNF α wurden untersucht. Endotoxinlevel wurden sowohl im PPG als auch im SG gemessen.

Standzeit:	≤ 2 Jahre	> 2 - < 10 Jahre	≥ 10 Jahre
Patienten [n]	8	8	8
Geschlecht [m/w]	2/6	3/5	4/4
Alter bei Revision [Jahre (Altersspanne)]	61,3 (45-72)	69,4 (51-88)	76,3 (64-83)
Lokalisation			
THA	3	5	7
TKA	5	3	1
Fixierungsart			
Zementiert	5	5	4
Zementfrei	3	3	4

Tab. 4.1 Tabellarische Übersicht der Patientendaten. THA = Totaler Hüftgelenkersatz, TKA = Totaler Kniegelenkersatz.

4.1.1. Histologie und Immunhistochemie

Histologisch zeigte sich ein sehr inhomogenes PPG mit zahlreichen Fibroblasten, Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen. In allen PPGs zeigten sich CD68 und S100a4 positive Zellen. Auch im SG stellten sich in allen Gewebeproben sowohl CD68 als auch S100a4 positive Zellen dar (Abbildung 4.1).

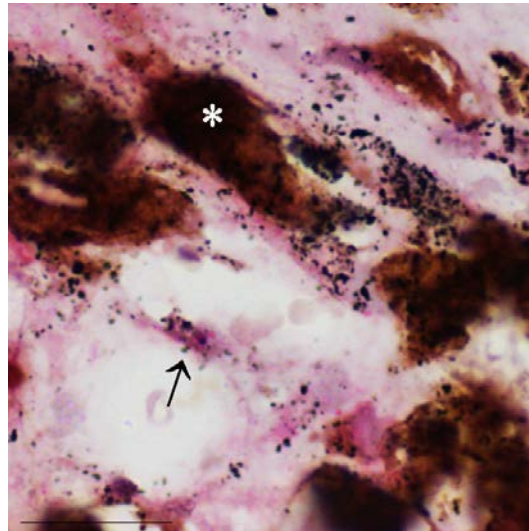


Abb. 4.1 Periprothetisches Gewebe (PPG) mit CD68 (braun) und S100a4 (rosa) Doppelfärbung. Abriebpartikel stellen sich hier nicht nur in multinukleären CD68 positiven Zellen (Stern) dar, sondern auch in Zellen, welche nur positiv für S100a4 (Pfeil) sind. Balken = 20µm (Hartmann et al., 2016).

In 14 von 24 (56%) PPGs konnten TRAP positive Zellen detektiert werden, einige waren in Knochenlakunen zu finden (Abbildung 4.2). In Serienschnitten färbten sich die TRAP positiven Zellen auch für CD68 (Abbildung 4.3). Hingegen zeigte sich im SG nur in 3 von 18 (16%) Proben TRAP positive Zellen. Bei einem Vergleich von TRAP positiven Zellen zwischen PPG und SG mittels exaktem Fisher-Test zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied ($p=0,0106$). Keine Unterschiede in der allgemeinen histologischen Darstellung konnten zwischen zementfreien und zementierten sowie TKA und THA Proben nachgewiesen werden. Beim Vergleich zwischen TKA und THA gab es keine signifikanten Unterschiede, es zeigten sich in 6 von 9 TKA (63%) und in 8 von 15 THA (53%) TRAP positive Zellen. In 8 von 14 (57%) Proben des zementierten- und in 6 von 10 (60%) Proben des zementfreien Gewebes konnten TRAP positive Zellen nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich auch hier keine

signifikanten Verteilungsunterschiede. TRAP positive Zellen konnten in 6 von 8 (75%) Proben maximal zwei Jahre nach Erstimplantation, in 6 von 8 (75%) Proben maximal 10 Jahre nach Erstimplantation und in 2 von 8 (25%) Gewebeproben mehr als 10 Jahren nach Erstimplantation detektiert werden, jedoch zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede.

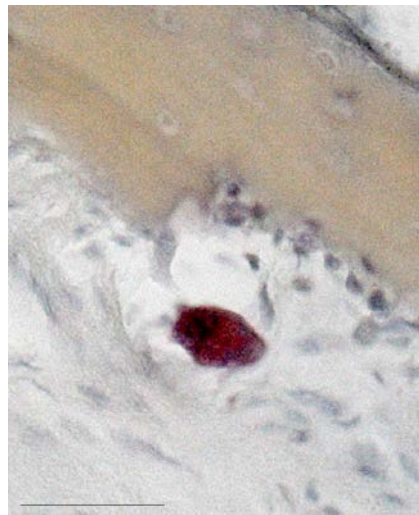


Abb. 4.2 TRAP Färbung eines Periprothetischen Gewebes bei aseptischer Endoprothesenlockerung zeigt multinukleäre Zelle in einer Knochenlakune. Balken = 50µm (Hartmann et al., 2016).

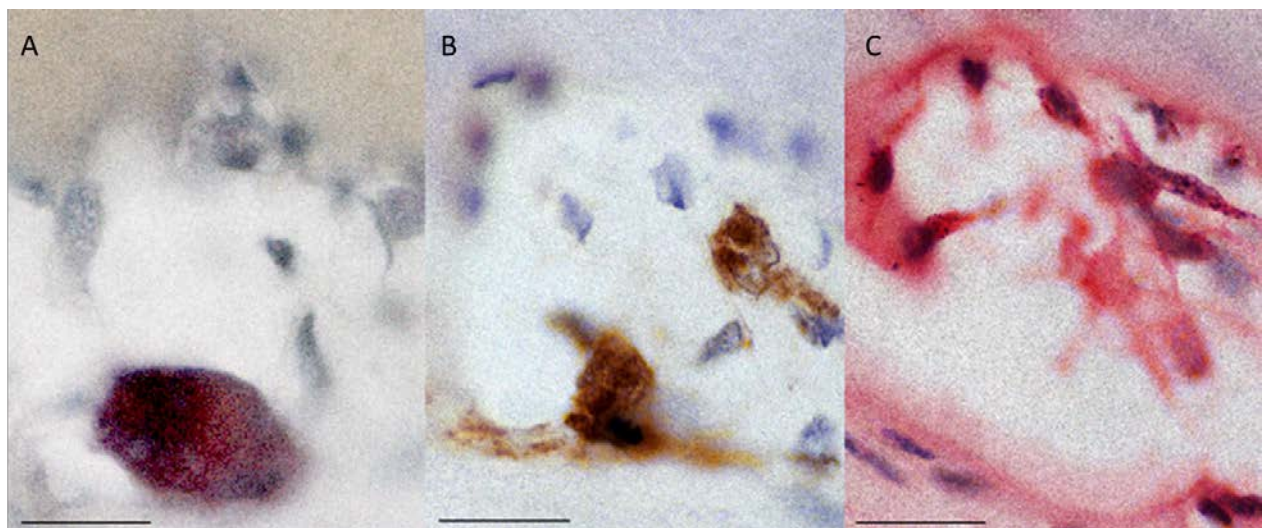


Abb. 4.3 Serienschritte von PPG aus aseptischen Endoprothesenlockerungen, die mit TRAP (A), CD68 (B) und dem fibroblastären Marker S100a4 (C) angefärbt wurden. Es zeigt sich eine multinukleäre Zelle, die positiv für TRAP und CD68 färbt. Im Umfeld dieser multinukleären Zelle befinden sich Fibroblasten ähnliche S100a4 positive Zellen. Balken = 20µm (Hartmann et al., 2016).

4.1.2. Relative Quantifizierung mittels Light Cycler

Die relative Quantifizierung von PPG (n=24) und SG (n=18) fand im Triplet statt. Für die relative Quantifizierung wird hier der Quotient zwischen der Ratio des Zielgens und der Ratio von GAPDH dargestellt.

4.1.2.1. Vergleich periprothetisches Gewebe mit Synovialgewebe

Für die mRNA Level der Zytokine M-CSF und TNF α konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 A und B).

Die Osteoklastogenese regulierenden Marker RANK ($p<0,001$) und RANK-L ($p=0,0013$) zeigen eine signifikant höhere mRNA Expression im PPG gegenüber dem SG (Abbildung 4.4 C und D). OPG verhält sich hingegen genau umgekehrt dazu. Hier konnte eine signifikant ($P<0,001$) höhere Expression im SG gegenüber dem PPG nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 E).

Auch zeigt sich im Median eine signifikant höhere RANK-L/OPG ($p<0,001$) Ratio im PPG zum SG (Abbildung 4.5).

Für den Osteoklasten Marker TRAP zeigte sich ein signifikant ($p<0,001$) höheres Expressionsniveau im PPG gegenüber dem SG (Abbildung 4.4 F). Die Zysteinproteinase Cathepsin K zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen PPG und SG (Abbildung 4.4 G).

Eine signifikant höhere ($p=0,004$) Expression im PPG gegenüber dem SG konnte auch für das proteolytische Enzym MMP-13 gezeigt werden (Abbildung 4.4 H).

Für die Osteoblasten Marker ALP ($p=0,0002$) und Kollagen Typ I ($p=0,0095$) konnten signifikant höhere Genexpression im PPG gegenüber dem SG gezeigt werden (Abbildung 4.4 I und K).

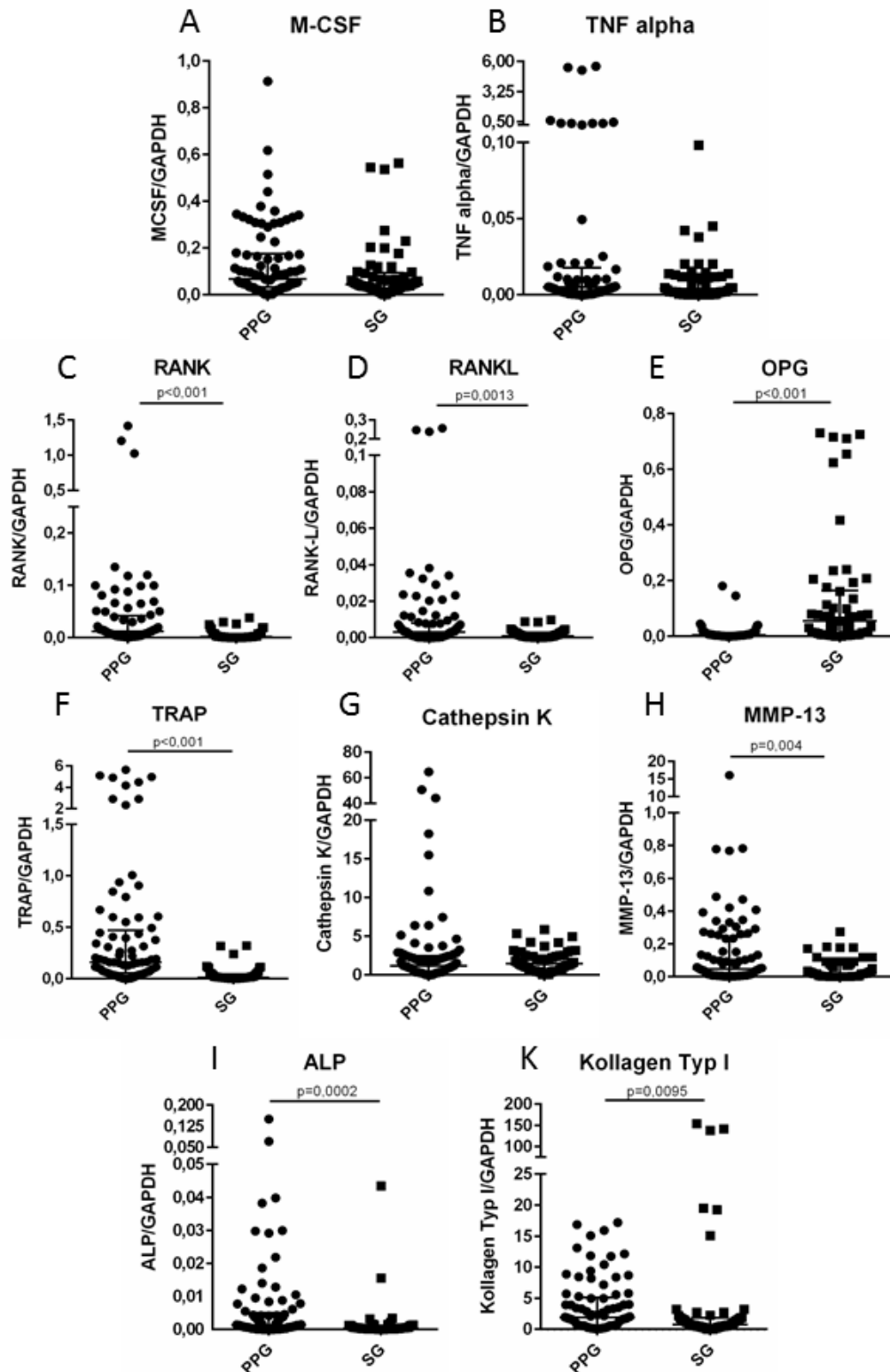


Abb. 4.4 Darstellung der relativen mRNA Expressionsunterschiede (Ratio target Gen/ Ratio GAPDH) zwischen PPG und SG für die Gene M-CSF (A), TNF α (B), RANK (C), RANK-L (D), OPG (E), TRAP (F), Cathepsin K (G), MMP-13 (H), ALP (I) und Kollagen Typ I (K). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., 2016).

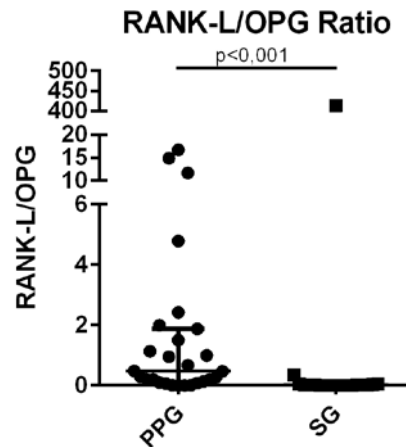


Abb. 4.5 Darstellung der Patientenbezogenen RANK-L/OPG Ratio. Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert (Hartmann et al., 2016).

4.1.2.2. Endotoxin

Zum weiteren Ausschluss von inflammatorischen Geschehen wurden die Endotoxin Level sowohl im PPG als auch im SG gemessen. Die Endotoxin Level zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen PPG und SG. In 8 von 19 PPGs sowie 9 von 16 SGs konnte Endotoxin Level über 0,005 EU/ml nachgewiesen werden (Abbildung 4.6). Für einzelne Proben liegt eine breite Streuung der Ergebnisse vor.

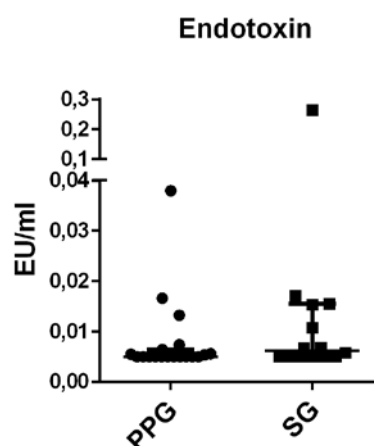


Abb. 4.6 Darstellung der Endotoxinlevel von PPG und SG in EU/ml. Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert (Hartmann et al., 2016).

4.1.2.3. Analyse von zementierten und zementfreien Prothesen

Für die Marker RANK, ALP und MMP-13 ergaben sich signifikante Unterschiede im Expressionsmuster zwischen zementierten und zementfreien Gewebeproben. Bei der Expression von RANK zeigte sich eine signifikant höhere Expression im zementierten Gewebe gegenüber dem zementfreien. Für ALP und MMP-13 zeigte sich diese Signifikanz genau umgekehrt (Tabelle 4.2).

Für TNF α , M-CSF, RANK-L, OPG, Kollagen Typ I, TRAP und Cathepsin K ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4.2).

Primer	Zementiert (n=14)	Zementfrei (n=10)	P Zementiert vs. Zementfrei
M-CSF	0,0638 (0,0212-0,1029)	0,1402 (0,0353-0,3068)	0,0612
TNF α	0,0067 (0,0006-0,0103)	0,0042 (0,0024-0,0281)	0,5849
RANK	0,0119 (0,0025-0,0188)	0,0109 (0,0065-0,0722)	0,0417*
RANK-L	0,0026 (0,0003-0,0073)	0,0033 (0,0009-0,0204)	0,1090
OPG	0,0045 (0,0031-0,0093)	0,0053 (0,0010-0,0116)	0,7641
Kollagen Typ I	1,9653 (0,6125-4,9678)	1,7133 (0,5829-5,0625)	0,8729
MMP-13	0,0172 (0,0052-0,1137)	0,0843 (0,0305-0,2606)	0,0291*
Cathepsin K	1,5505 (0,7722-2,8505)	0,9352 (0,2941-1,9706)	0,1499
ALP	0,0005 (0,0001-0,0019)	0,0038 (0,0013-0,0110)	< 0,001*
TRAP	0,1535 (0,0678-0,4081)	0,1897 (0,0527-0,5383)	0,5721

Tab. 4.2 Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen zementierten und zementfreien aseptischen Endoprothesenlockerungen. Ergebnisse sind normalisiert gegen GAPDH. Die mRNA Unterschiede wurden mit dem Man-Whitney-U Test durchgeführt. Es wird Median mit IQR angegeben. Signifikante p-Werte sind mit * gekennzeichnet.

4.2. Periprothetische Fibroblasten-ähnliche Zellen

Die periprothetische Fibroblasten-ähnlichen (PPFs, n=12) und Fibroblasten-ähnliche Zellen aus Synovialgewebe (SF, n=6) wurden wie in 3.2.1.6. beschrieben isoliert.

Nach drei Passagen wurden die Zellen im Monolayer (2D) sowie im Transwellssystem (3D) kultiviert. Zum Ausschluss TRAP positiver Zellen wurden die Fibroblasten-ähnlichen Zellen zu Beginn mit einem TRAP-Kit gefärbt. Aus den Transwellmembranen wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese mit dem fibroblastären Marker S100a4 gefärbt.

Das Expressionsverhalten zwischen Transwell- und Monokultur wurde auf die Marker RANK-L, OPG, Cathepsin K, MMP-13, ALP, Kollagen Typ I sowie M-CSF und TNF α an den Tagen 10 und 21 untersucht.

4.2.1. Histologie und Immunhistochemie

4.2.1.1. Monolayer Kultivierung

Die im Monolayer kultivierten Zellen wiesen in Passage 4 durchgehend eine spindelförmige Morphologie auf mit regelmäßiger Ausbreitung in den Zellkulturflaschen (Abbildung 4.7 A - F). TRAP positive Zellen konnten weder in den PPFs (Abbildung 4.7 A - C) noch in den SFs (Abbildung 4.7 D - F) an den Tagen 1, 10 und 21 nachgewiesen werden.

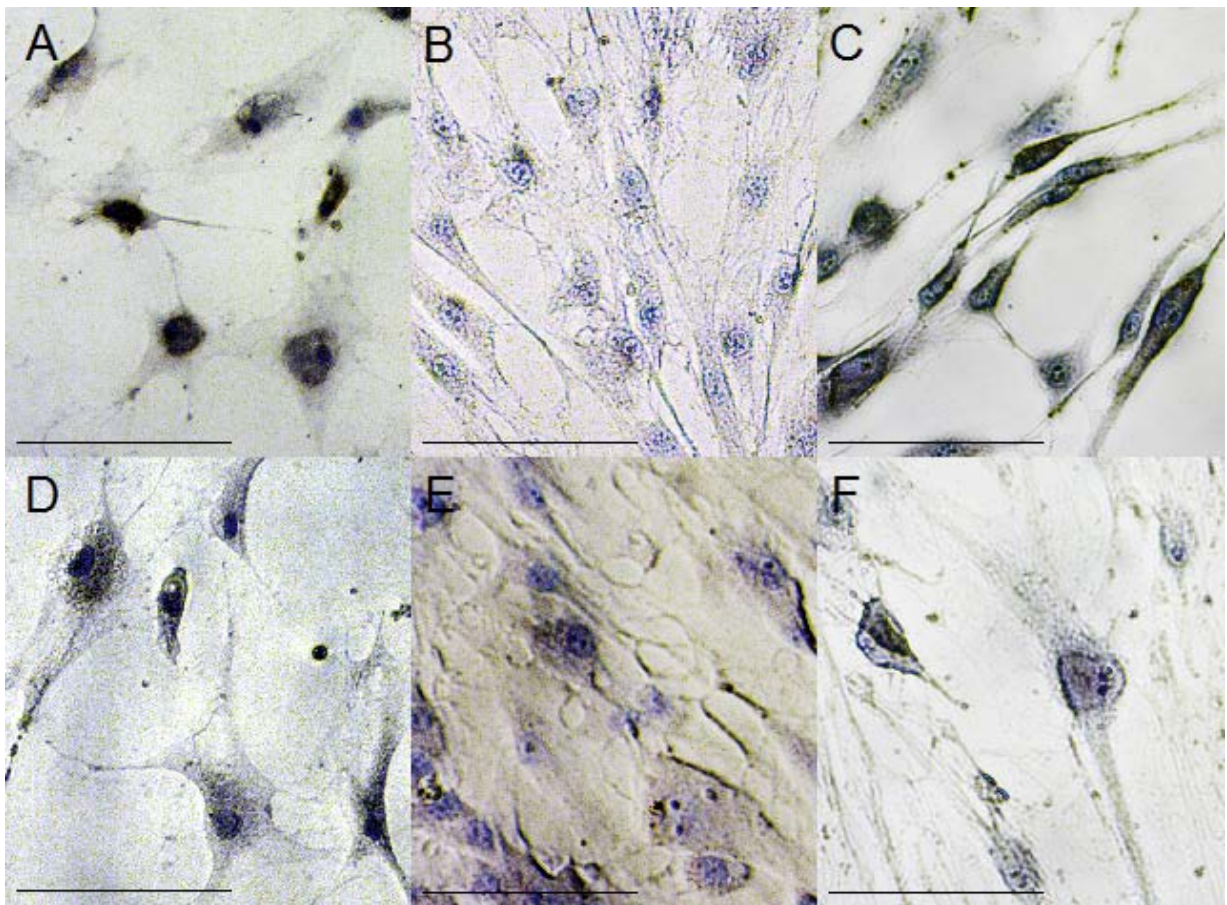


Abb. 4.7 Kultivierung von PPFs (A - C) und SFs (D - F) im Monolayer. Bilder A bis F sind Lichtmikroskopische Aufnahmen nach TRAP Färbung im 24 Well. Es zeigen sich an den Tagen 1 (A und D), 10 (B und E) sowie 21 (C und F) keine TRAP positiven Zellen in der Monokultur. Die Zellen zeigen alle eine fibroblastenartige spindelförmige Morphologie. Balken = 100µm (Hartmann et al., B).

4.2.1.2. Transwellmembran Kultivierung

Die PPFs und SFs wurden an den Tagen 10 und 21 immunhistologisch mit dem fibroblastären Marker S100a4 angefärbt. An den Tagen 10 und 21 ist in Transwellkulturen eine Polylayerstruktur zu sehen. Sowohl die PPFs als auch die SFs färbten sich positiv für S100a4 an den Tagen 10 und 21 (Abbildung 4.8 A - D und Abbildung 4.9 A - D).

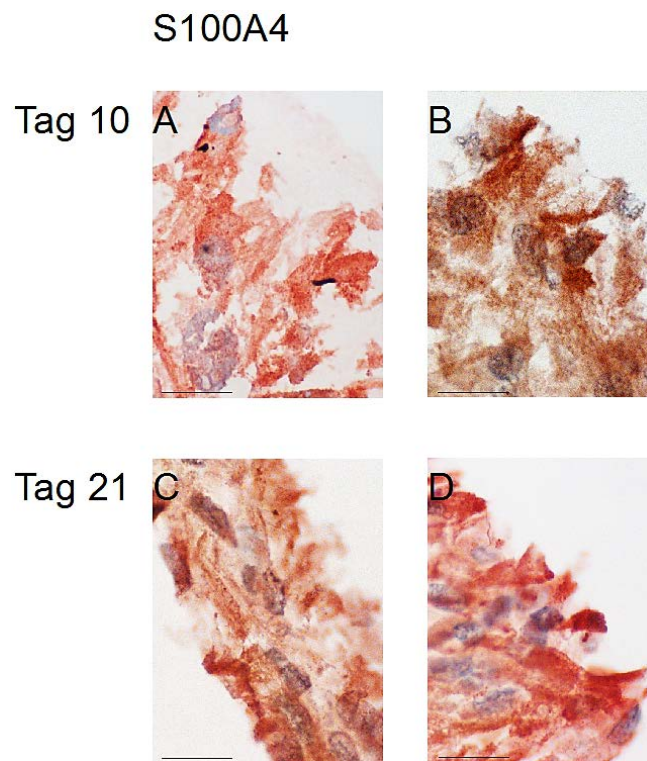


Abb. 4.8 Dreidimensionale Kultivierung von PPFs auf einer Transwellmembran an den Tagen 10 (A und B) und 21 (C und D). Immunhistologische Anfärbung mit dem fibroblastären Marker S100a4 (A - D). Maßstabsbalken = 20µm (Hartmann et al., B).

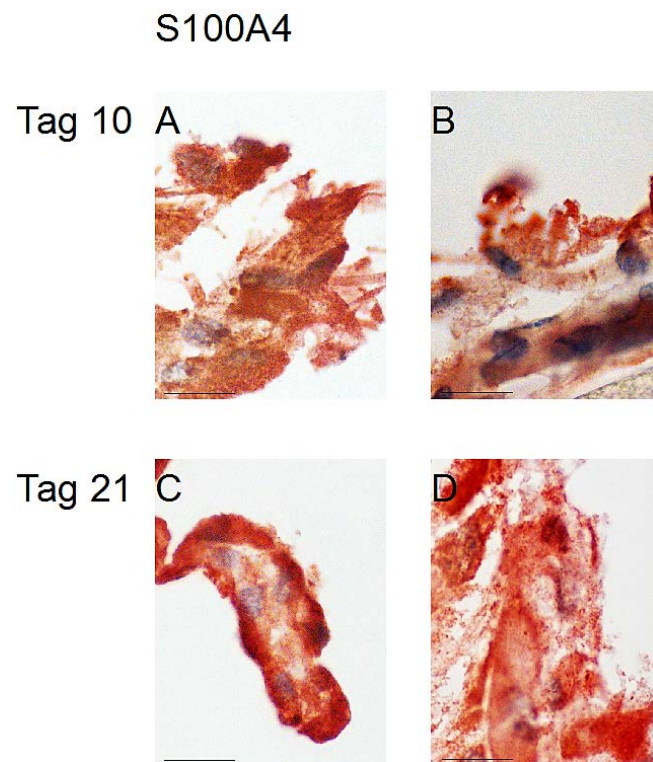


Abb. 4.9 Dreidimensionale Kultivierung von SFs auf einer Transwellmembran an den Tagen 10 (A und B) und 21 (C und D). Immunhistologische Anfärbung mit dem fibroblastären Marker S100a4 (A - D). Maßstabsbalken = 20µm (Hartmann et al., B).

4.2.2. Relative Quantifizierung mittels Light Cycler

Die relative Quantifizierung von PPFs (n=12) und SFs (n=6) fand in allen Kulturformen im Tripletts statt. Für die relative Quantifizierung wird hier die Delta-Delta- C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Methode angewendet.

RANK-L Expression

Für PPFs (alle $p < 0,001$) und SFs (d10 $p < 0,001$, d21 $p = 0,0306$) zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression im Transwell- gegenüber der Monolayerkultivierung. An Tag 10 ist die Expression von RANK-L in den PPFs in der Transwellkultivierung ($p = 0,035$) signifikant höher gegenüber den SFs. Über den Zeitverlauf kommt es im Monolayer der SFs zu einer signifikanten ($p = 0,0101$) Zunahme der Expression von Tag 10 auf Tag 21 (Abbildung 4.10 A und B).

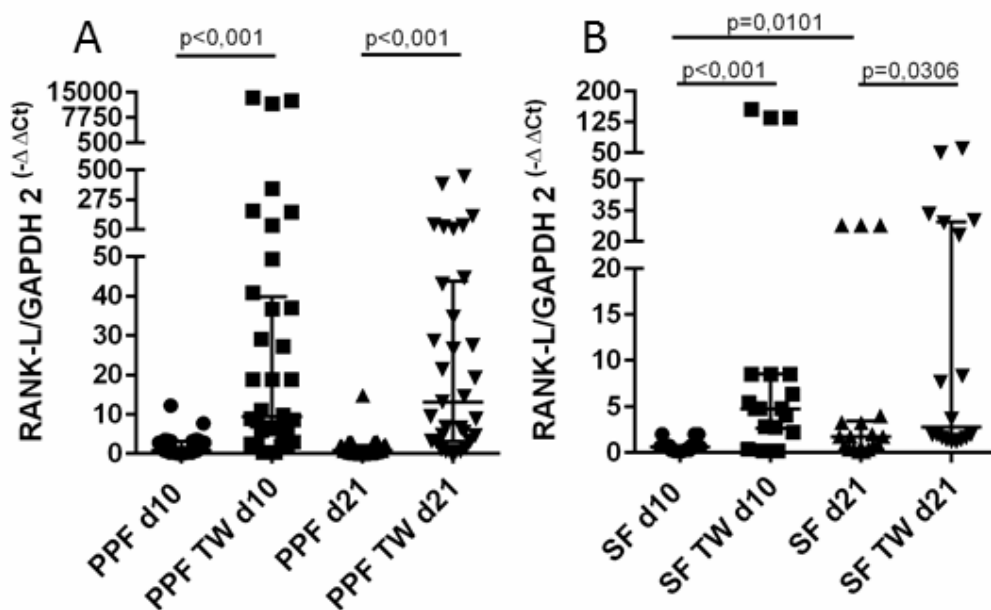


Abb. 4.10 Darstellung des Expressionsverhaltens von RANK-L der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

OPG Expression

OPG zeigt sowohl in den PPFs (d10 $p=0,0281$, d21 $p=0,0162$) als auch in den SFs (d10 $p=0,0029$, d21 $p=0,003$) an beiden Tagen eine signifikant niedrigere Expression in der Transwell- gegenüber der Monolayerkultivierung. Beim Vergleich zwischen PPFs und SFs zeigt sich an Tag 21 in der Monolayerkultivierung eine signifikant verminderte Expression in den PPFs gegenüber den SF-Kulturen ($p=0,0154$). Beim Zeitverlauf zeigen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede (Abbildung 4.11 A und B).

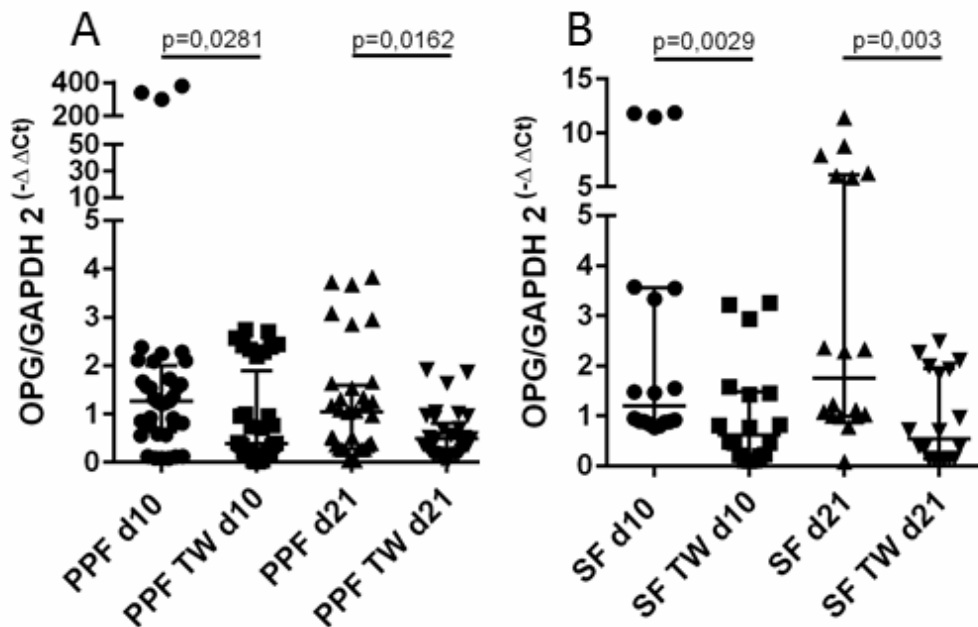


Abb. 4.11 Darstellung des Expressionsverhaltens von OPG der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

RANK-L/OPG Ratio

Die RANK-L/OPG Ratio ist sowohl in den PPFs als auch in den SFs an den Tagen 10 und 21 (PPFs $p < 0,001$, SFs $p = 0,0008$) im Transwell System signifikant erhöht gegenüber dem Monolayer. Beim Vergleich zwischen PPFs und SFs zeigt sich im Transwell an Tag 10 eine signifikant höherer RANK-L/OPG Ratio in den PPFs ($p = 0,0155$) (Abbildung 4.12 A und B).

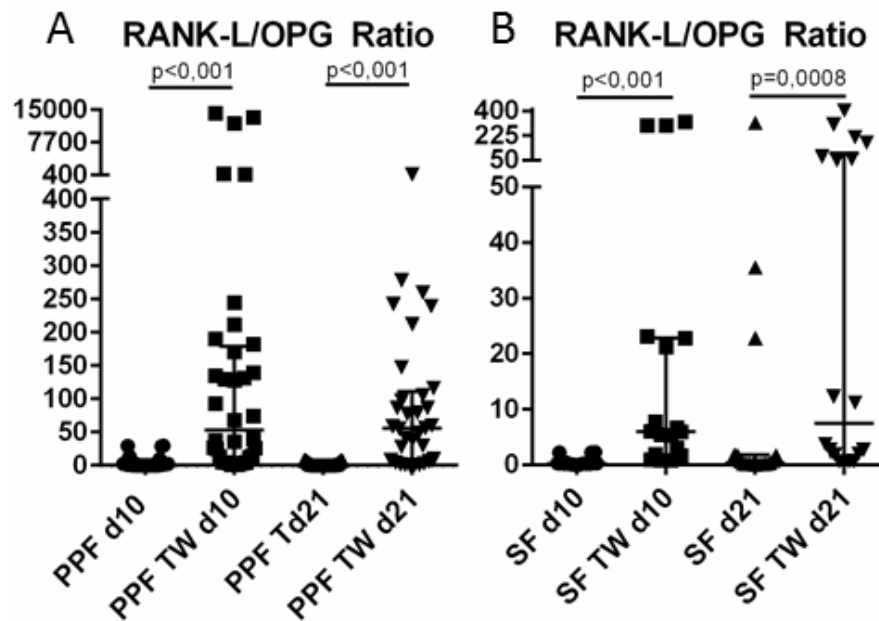


Abb. 4.12 Darstellung des RANK-L/OPG Ratio in PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Cathepsin K Expression

Für die Zysteinproteinase Cathepsin K zeigt sich eine vermehrte Expression in der Transwellkultur für PPFs (alle $p < 0,001$) an beiden Tagen und für SFs an Tag 10 ($p = 0,0004$). In der Monolayerkultur wird an Tag 10 eine signifikant vermehrte Expression in den SFs gegenüber den PPFs detektiert ($p = 0,0045$). Im Transwellsystem kommt es am Tag 21 zu einer signifikant ($p = 0,0085$) höheren Expression in den PPFs gegenüber den SFs. Im Zeitverlauf zeigt sich sowohl für PPFs ($p < 0,001$) als auch für SFs ($p = 0,0208$) in der Monolayerkultur eine signifikante Expressionszunahme (Abbildung 4.13 A und B).

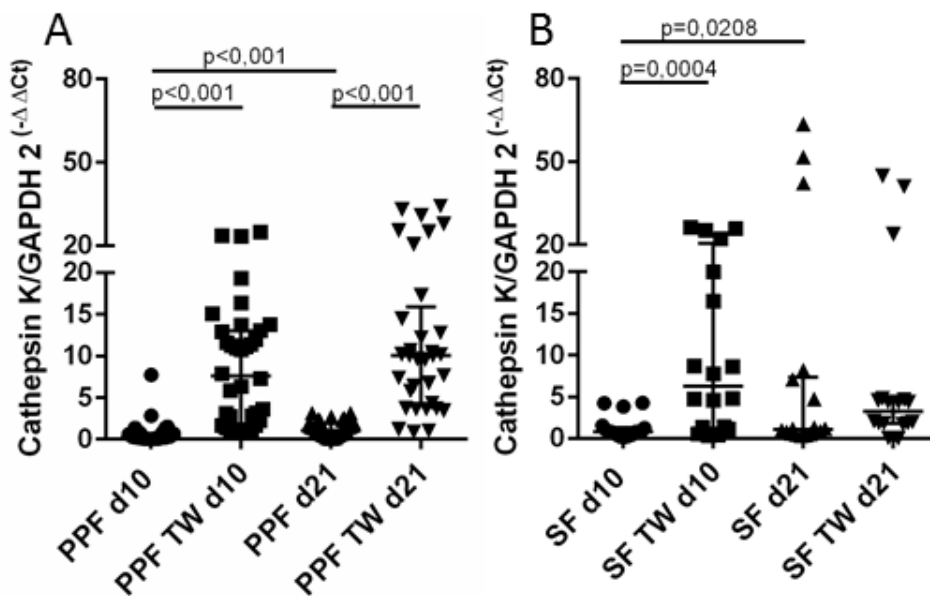


Abb. 4.13 Darstellung des Expressionsverhaltens von Cathepsin K der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

MMP-13 Expression

Bei der Proteinase MMP-13 zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression in der Transwell- gegenüber der Monolayerkultivierung an den Tagen 10 und 21 sowohl für PPFs (alle $p < 0,001$) als auch für SFs (d10 $p = 0,0012$, d21 $p < 0,001$). Beim Vergleich zwischen PPFs und SFs zeigen sich in beiden Kultivierung-Systemen und an beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede. Im Zeitverlauf zeigte sich im Transwellssystem für SFs eine signifikante Expressionszunahme von d10 auf d21 ($p = 0,0304$) (Abbildung 4.14 A und B).

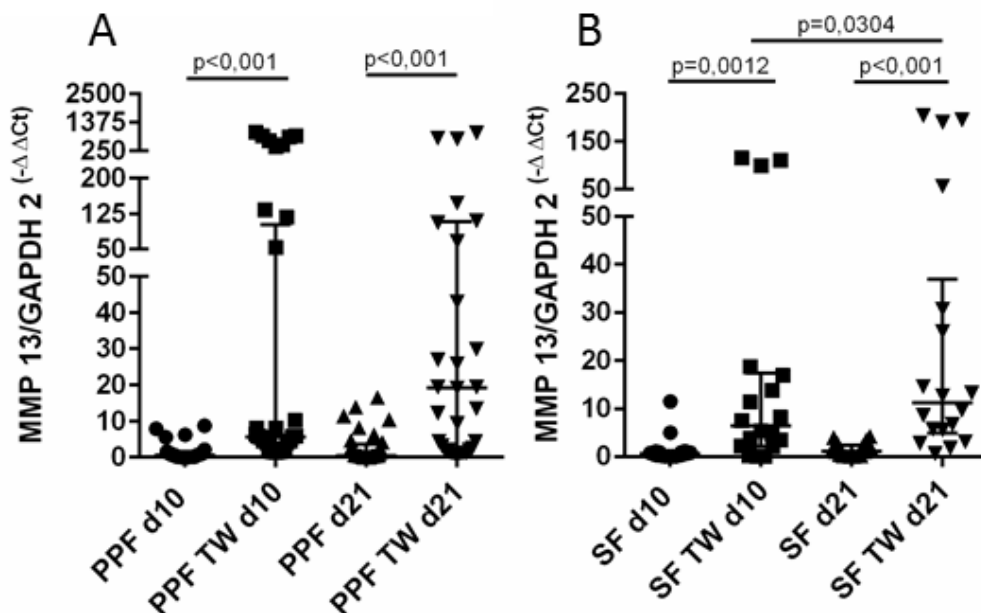


Abb. 4.14 Darstellung des Expressionsverhaltens von MMP-13 der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

M-CSF Expression

Keine Unterschiede konnten in der Expression zwischen Transwell- und Monolayerkultivierung in PPFs für M-CSF gesehen werden. Bei den SFs zeigte sich eine signifikant ($p=0,0004$) niedrigere Expression in der Transwellkultivierung an Tag 21. Beim Vergleich der Expressionslevel zwischen PPFs und SFs zeigen sich für beide Kultivierungsformen keine signifikanten Expressionsunterschiede. Sowohl bei den PPFs ($p<0,001$) als auch bei SFs ($p=0,0304$) kommt es in der Monolayerkultivierung von Tag 10 auf Tag 21 zu einer signifikanten Expressionszunahme (Abbildung 4.15 A und B).

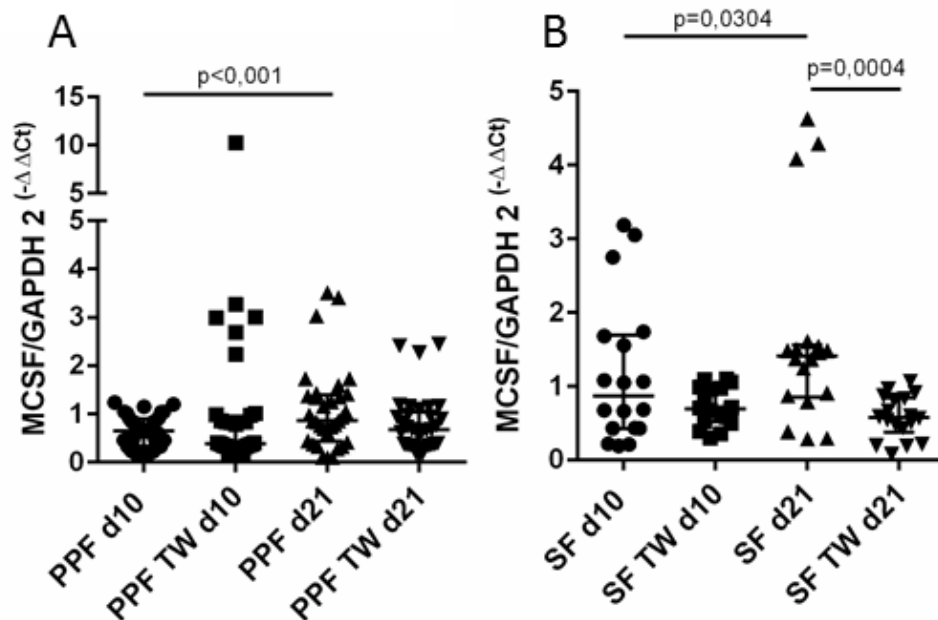


Abb. 4.15 Darstellung des Expressionsverhaltens von M-CSF der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

TNF α Expression

Für das proinflammatorische Zytokin TNF α konnte eine signifikant vermehrte Expression im Transwell System gegenüber der Monolayerkultivierung in PPFs ($p=0,0445$) und SFs ($p=0,0458$) an Tag 21 gezeigt werden. Sowohl beim Vergleich zwischen PPFs und SFs als auch beim Vergleich der beiden Zeitpunkte konnten für TNF α keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abbildung 4.16 A und B).

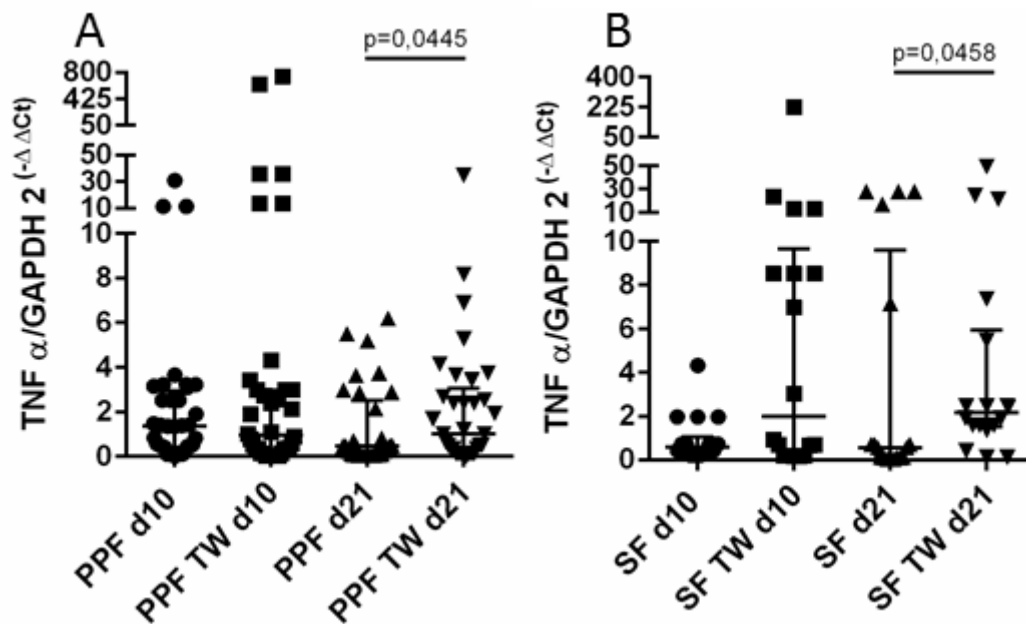


Abb. 4.16 Darstellung des Expressionsverhaltens von TNF α der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Alkalische Phosphatase

Die Expression von ALP zeigt am Tag 21 sowohl in PPFs ($p=0,0096$) als auch in SFs ($p=0,0002$) eine signifikant niedrigere Expression im Transwell System gegenüber dem Monolayer. Beim Vergleich zwischen PPFs und SFs konnte an Tag 21 in der Transwellkultivierung eine signifikant höhere Expression in den PPFs ($p=0,0027$) festgestellt werden. Im Zeitverlauf zeigt sich im Transwell eine signifikante Expressionsabnahme der SFs ($p=0,0026$) (Abbildung 4.17 A und B).

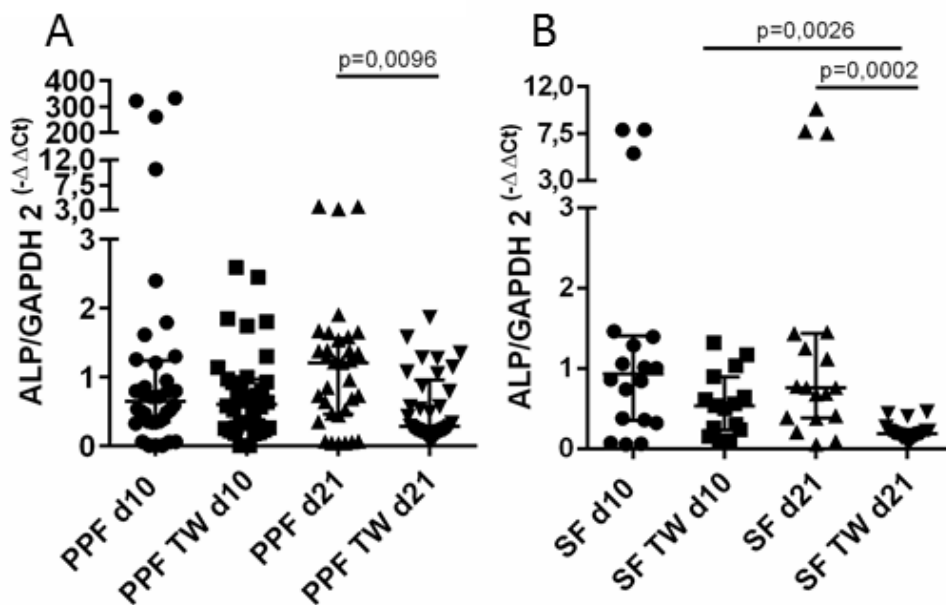


Abb. 4.17 Darstellung des Expressionsverhaltens von ALP der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Kollagen Typ I

Kollagen Typ I zeigt sowohl in den PPFs als auch in den SFs an Tagen 10 und 21 eine signifikant vermehrte Expression in der Monolayerkultivierung (PPFs: d10 $p=0,0034$, d21 $p=0,0036$, SFs: d10 $p=0,0018$, d21 $p=0,0033$). An Tag 21 zeigen PPFs eine signifikant ($p=0,0093$) niedrigere Expression im Monolayer gegenüber den SFs. Über den Zeitverlauf kann im Monolayer ($p=0,0279$) sowie im Transwell ($p=0,0152$) bei den PPFs eine signifikante Abnahme beobachtet werden (Abbildung 4.18 A und B).

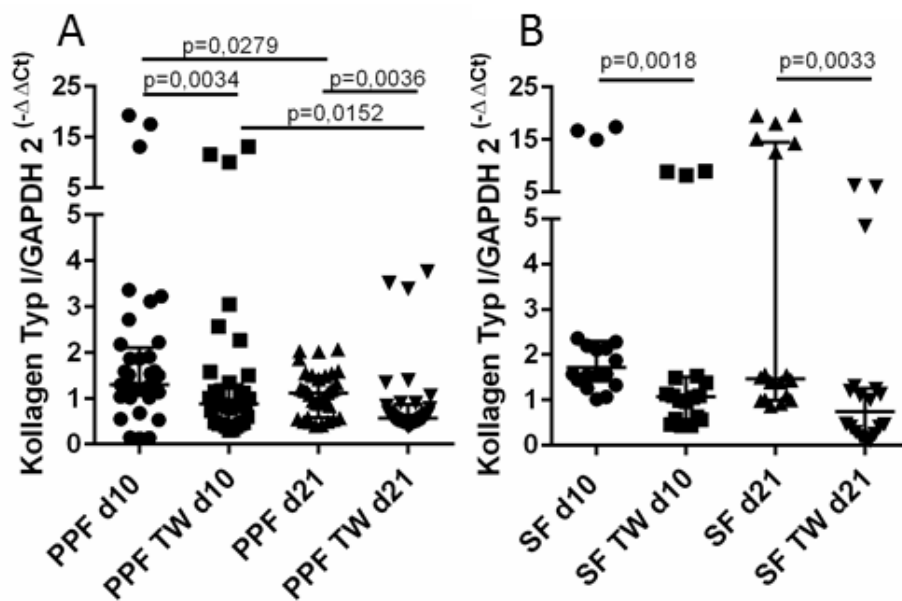


Abb. 4.18 Darstellung des Expressionsverhaltens von Kollagen Typ I der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

5. Diskussion

5.1. Analyse molekularer Komponenten

In unserer Studie wurde das Periprothetische Gewebe (PPG) und das Synovialgewebe (SG) auf die osteoklastenregulierenden Marker (RANK, RANK-L und OPG), die proteolytischen Enzyme (MMP-13 und Cathepsin K), den Osteoklastenmarker (TRAP), die osteogenen Marker (ALP und Kollagen Typ I) sowie die Zytokine M-CSF und TNF α untersucht. Für RANK, RANK-L, TRAP, MMP-13, ALP und Kollagen Typ I konnte eine signifikant höhere Expression im PPG gegenüber dem SG nachgewiesen werden. Für den Gegenspieler von RANK-L, OPG zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression im PPG im Vergleich zum SG. Des weiteren konnte eine erhöhte RANK-L/OPG Ratio im PPG gegenüber dem SG gesehen werden. Cathepsin K, M-CSF, TNF α sowie das Endotoxin Screening zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen PPG und SG auf.

Das RANK/RANK-L/OPG System spielt bei der aseptischen Lockerung eine wichtige Rolle (Grimaud et al., 2003; Mandelin et al., 2003). Eine erhöhte RANK-L/OPG Ratio konnte bei einer Reihe von knochendestruierenden Prozessen beschrieben werden (Grimaud et al., 2003) und wird auch bei der aseptischen Endoprothesenlockerung beschrieben (Crotti et al., 2004; Koulouvaris et al., 2008; Mandelin et al., 2003; Veigl et al., 2007). In Bezug auf die RANK-L/OPG Ratio finden sich Unterschiede bei den Expressionsniveaus von RANK-L und OPG. Eine erhöhte RANK-L/OPG Ratio kann einerseits durch eine erhöhte Expression von RANK-L (Crotti et al., 2004; Mandelin et al., 2003) und andererseits durch eine verminderte Expression von OPG (Crotti et al., 2004; Jansen et al., 2014; Koulouvaris et al., 2008; Tomankova et al., 2014) hervorgerufen werden. In dieser Studie lag eine erhöhte RANK-L Expression im PPG im Vergleich zum SG vor. In „gesundem“ Gewebe von Patienten die sich einer Kniearthroskopie unterziehen zeigen sich die niedrigsten Expressionen von RANK-L im Vergleich mit PPG oder SG (Crotti et al., 2004). RANK-L wird von einer Reihe von Zellen wie Osteoblasten, Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Knochenmark-Stroma-Zellen (Crotti et al., 2004; Hercus and Revell, 2001) exprimiert. Eine vermehrte RANK-L Expression steht in Zusammen-

hang mit vermehrtem Knochenabbau und periprotetischen Osteolysen (Crotti et al., 2004; Mandelin et al., 2003; Takei et al., 2000; Veigl et al., 2007). Doppelfärbungen demonstrieren, dass Zellen, die positiv für den Makrophagenmarker CD68 waren, auch RANK-L enthielten. Jedoch konnte nicht geklärt werden ob diese Zellen RANK-L produzieren oder nur binden (Crotti et al., 2004). Es gibt Hinweise, dass Abriebpartikel die Expression von RANK-L durch Makrophagen stimulieren können (Haynes et al., 2001). Daneben zeigten auch Zellen, die positiv für die Fibroblasten Marker 5B5 und ICAM-1, waren eine Expression von RANK-L (Ramage et al., 2007). Insgesamt bestätigten unsere Ergebnisse die wichtige Rolle von RANK-L bei der aseptischen Endoprothesenlockerung, wie auch in der Literatur beschrieben.

In unserer Studie zeigte sich zudem eine verminderte Expression von OPG im PPG gegenüber dem SG. Auch für eine niedrigere Expression von Osteoprotegerin im PPG gegenüber dem SG finden wir Nachweise in der Literatur (Crotti et al., 2004; Jansen et al., 2014; Koulouvaris et al., 2008; Tomankova et al., 2014). Neben niedrigeren Expressionen von OPG gibt es Studien, die eine konstante Genexpression von OPG aufzeigen (Crotti et al., 2004; Mandelin et al., 2003). OPG konnte in Endothelzellen kleiner Blutgefäße im PPG (Crotti et al., 2004), sowie in periprotetischen Fibroblasten nachgewiesen werden (Ramage et al., 2007). Des Weiteren zeigen Osteoblasten nach Abriebpartikelstimulation eine verminderte Expression von OPG (Atkins et al., 2009). OPG kann die Interaktion von RANK-L mit RANK verhindern und dadurch die Osteoklastendifferenzierung reduzieren (Simonet et al., 1997). Durch die verminderte Expression von OPG könnte im PPG der Regulationsmechanismus des Knochenhaushaltes zugunsten des Knochenabbaus hin verschoben sein.

RANK, welches in osteoklastären Vorläuferzellen exprimiert wird und nach Bindung des RANK-Liganden die Differenzierung zu Osteoklasten induziert, wurde signifikant vermehrt im PPG gegenüber dem SG exprimiert. Auch in der Literatur gibt es Hinweise, dass RANK im PPG vermehrt exprimiert wird (Crotti et al., 2004; Mandelin et al., 2003). In unserer Studie konnten wir auch eine signifikant höhere Expression von TRAP im PPG gegenüber dem SG nachweisen. Osteoklasten bilden TRAP nach vollständiger Differenzierung (Crotti et al., 2004). TRAP positive Zellen konnten in 56% des PPGs detektiert werden, hingegen zeigten sich in weniger als 20% des SGs TRAP positive Zellen. Eine vermehrte Expression von TRAP im PPG wird auf mRNA

Ebene (Koulouvaris et al., 2008) und immunhistologisch (Crotti et al., 2004; Kadoya et al., 1994) bestätigt. In „gesundem“ Gewebe von Patienten, die sich einer Kniearthroskopie unterziehen, konnten keine TRAP positiven Zellen im Gegensatz zu SG und PPG Gewebe nachgewiesen werden (Crotti et al., 2004). Die hohe Expression von RANK im PPG könnte auf eine vermehrte Ausbildung TRAP positiver Osteoklasten aus Makrophagen und Monozyten hindeuten, die zu periprosthetischen Osteolysen beitragen könnten.

Eines der wichtigsten proteolytischen Enzyme für den Kollagenabbau im Knochen ist Cathepsin K, das die Trippelhelix des Kollagens an vielen Stellen spalten kann (Garnero et al., 1998). Cathepsin K wird durch einen autokatalytischen Prozess bei niedrigem pH aktiviert und spielt eine Rolle bei der Knochendemineralisierung (Konttinen et al., 2001).

Die starke Akkumulation von demineralisierten Kollagen Fibrillen in der Resorptionszone von Cathepsin K Knock Out Mäusen, ist der beste Nachweis dafür, dass Cathepsin K eine wichtige Rolle beim Kollagenabbau spielt (Gowen et al., 1999; Saftig et al., 1998). In unserer Studie konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede von Cathepsin K zwischen PPG und SG festgestellt werden. Andere Studien zeigten eine signifikant höhere Expression von Cathepsin K im PPG gegenüber dem SG (Crotti et al., 2004; Kadoya et al., 1994; Koulouvaris et al., 2008). Cathepsin K wird vor allem von Osteoklasten exprimiert, konnte aber auch in Makrophagen, Riesenzellen (Konttinen et al., 2001) und periprosthetischen Fibroblasten (Mandelin et al., 2005) nachgewiesen werden. Delaisse et al. stellte die Hypothese auf, dass Cathepsin K und die Proteinase MMP-13 an unterschiedlichen Zeitpunkten der Knochenresorption wirken. Beim Einsatz von MMP-Inhibitoren scheinen diese eine spätere Wirkung auf die Knochenresorption zu haben als Zysteinproteinasen wie Cathepsin K (Delaisse et al., 2003). Demnach könnte Cathepsin K eine stärkere Expression zu früheren Zeitpunkten in der osteolysen Entstehung gehabt haben.

Neben Cathepsin K kann die Rolle anderer Proteinasen wie der Matrix Metalloproteinasen nicht außer acht gelassen werden. Die signifikante Korrelation zwischen einem gesteigerten Kollagenabbau und der vermehrten Expression von MMP-13 und Cathepsin K (Ma et al., 2006) lässt die Vermutung zu, dass beide Enzymklassen eine wichtige Rolle bei der Kollagendestruktion spielen. MMP-13, ein Enzym, das Knochenmatrix abbauen kann, wurde vermehrt in der Resorptionszone von Osteoklas-

ten detektiert (Delaisse et al., 1987). Eine signifikant höhere Expression von MMP-13 im PPG gegenüber dem SG konnte in dieser Studie gesehen werden. Auch in der Literatur findet sich eine vermehrte Expression von MMP-13 gegenüber dem SG (Diehl et al., 2004; Imai et al., 1998; Takei et al., 2000). MMP-13 wird vor allem von periproteischen Fibroblasten exprimiert (Imai et al., 1998; Wagner et al., 2008). Welches proteolytische Enzym die Vorreiter Rolle bei der aseptischen Endoprothesenlockerung übernimmt ist noch nicht geklärt.

Ein weiteres wichtiges Zytokin für die Osteoklastendifferenzierung stellt M-CSF dar. M-CSF konnte vor allem in Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen lokalisiert werden (Xu et al., 1997). Makrophagen, welche mit M-CSF stimuliert werden, entwickeln einen anti-inflammatorischen Phänotyp. Dieser Phänotyp ist auch bekannt als M2 Polarisation oder alternative Makrophagen Aktivierung (Azuma et al., 2000; Takahashi et al., 2007). Auf der anderen Seite zeigen Makrophagen, welche durch Abriebpartikel oder GM-CSF stimuliert werden einen pro-inflammatorischen Phänotyp, bekannt als klassischer Makrophagen Aktivierungsweg oder M1. Zum Zeitpunkt der Revisionsoperationen finden sich im PPG sowohl M1 als auch M2 Makrophagen. Der Phänotyp scheint durch lokale und systemische Faktoren, die nicht den traditionellen Makrophagen polarisierenden Zytokinen entsprechen, reguliert zu sein (Jansen et al., 2014). Wie wichtig die Anwesenheit von M-CSF ist, zeigt die Tatsache, dass eine Osteoklastenbildung durch Blockade mit einem M-CSF Antikörper verhindert werden kann und M-CSF für Osteoklastenbildung und osteoklastäre Knochenresorption erforderlich ist (Fan et al., 2001; Neale et al., 1999; Xu et al., 1997; Yao et al., 2002). Demnach vermuten wir, dass M-CSF eine Rolle bei der aseptischen Endoprothesenlockerung spielt aber kein Schlüsselenzym wie RANK-L oder OPG darstellt.

Das proinflammatorische Enzym TNF α kann *in vivo* und *in vitro* die Knochenresorption durch die Ausbildung und Aktivierung von Osteoklasten fördern (Kitazawa et al., 1994; Schwarz et al., 2000). TNF α stellt ein zentrales inflammatorisches Zytokin in der Pathogenese der Osteoarthritis dar (Wojdasiewicz et al., 2014). Außerdem hat es eine wichtige Funktion bei der Pathogenese immunvermittelter Entzündungskrankheiten, die durch den Einsatz von anti-TNF α Blocker bestätigt werden konnten (Davis et al., 2003). TNF α wird im PPG vor allem von aktivierten Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten exprimiert (Goodman et al., 1998). Wir konn-

ten für TNF α keine signifikanten Expressionsunterschiede feststellen, es besteht jedoch die Tendenz zur vermehrten Expression im PPG gegenüber dem SG. Jamsen et al. bestätigt unsere Ergebnisse, auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen dem PPG und dem SG Gewebe gezeigt werden (Jamsen et al., 2014). Hingegen gibt es Studien die eine vermehrte Expression von TNF α im PPG aufzeigen (Koreny et al., 2006; Xu et al., 1996). Sowohl Jamsen et al. als auch unsere Studie hat Patienten mit rheumatoider Arthritis und entzündlichen Gelenkerkrankungen aus beiden Gruppen ausgeschlossen. Erhöhte TNF α Level könnten auch auf entzündliche Erkrankungen zurück zuführen sein. Der Ausschluss von rheumatoiden und entzündlichen Gelenkerkrankungen in unsere Studie kann als „verbesserter Goldstandard“ angesehen werden. Veränderungen in der Expression inflammatorischer Zytokinen werden dadurch nicht durch das Vorliegen entzündlicher Erkrankungen beeinflusst.

Auch Osteoblasten spielen bei der aseptischen Endoprothesenlockerung eine wichtige Rolle. Sie tragen durch Sekretion extrazellulärer Bestandteilen wie Kollagen Typ I (90% der Extrazellulären Matrix) (Calvo et al., 1996) zur Knochenbildung bei. In dieser Studie zeigte sich eine signifikant höhere Expression von Kollagen Typ I und ALP im PPG gegenüber dem SG. Unserer Kenntnis nach liegen zur Expression von Kollagen Typ I und ALP in PPG und SG keine Studien vor. Es gibt Studien die zeigen, dass Titaniumpartikel zu einer Abnahme der Genexpression von ALP und Kollagen Typ I in Osteoblasten führen können (Lochner et al., 2011; Queally et al., 2009; Sun et al., 1997). Aufgrund dessen hätten wir eine Expressionsabnahme von ALP und Kollagen Typ I vermutet. Die Ergebnisse in dieser Studie zeigen, dass sich sowohl ALP als auch Kollagen Typ I in den Regulationsmechanismen von den *in vitro* Versuchen zu unterscheiden scheinen. Es gibt Studien die zeigen, dass Osteoblasten nach Titaniumpartikel Stimulation eine vermehrte Kollagen Produktion zeigen und die Expression von ALP unverändert bleibt (Ramachandran et al., 2006). Der Autor vermutet hier, dass Osteoblasten durch Partikelstimulation vermehrt fibröses Bindegewebe bilden als Knochen (Ramachandran et al., 2006). Andere Studien zeigen, dass mesenchymale Stammzellen nach Partikelstimulation eine vermehrte Expression von ALP zeigen (Cordonnier et al., 2010). Weitere Studien sind für die Untersuchung der ALP und Kollagen Typ I Expression bei aseptischer Endoprothesenlockerung erforderlich.

Viele Zellkultur- und Tiermodellstudien unterstützen die Vermutung, dass Endotoxin zum osteolytischen Prozess bei der aseptischen Endoprothesenlockerung beitragen kann (Bi et al., 2001; Brooks et al., 2002; Greenfield et al., 2010). Anhaftendes Lipopolysaccharid (LPS) ist in der Lage die biologische Aktivität von Abriebpartikeln *in vivo* und *in vitro* zu verstärken (Greenfield et al., 2010). In *in vitro* Mäuse Modellen sowie in Kulturen mit mononukleären Zellen konnte gezeigt werden, dass Endotoxinanhaftende Abriebpartikel eine vermehrte Produktion von IL-6 und TNF α sowie eine vermehrte Ausbildung von Osteolysen induzieren (Abu-Amer et al., 1997; Bi et al., 2001; Ragab et al., 1999). Im Gegensatz dazu kommt es beim Einsatz endotoxinfreier Abriebpartikel nicht zur Ausbildung von TRAP positiven Zellen aus mononukleären Zellen und zu einer verminderten Produktion von TNF α und IL-6 (Bi et al., 2001). Auch die Ausbildung von Osteolysen ist mit endotoxinfreien Abriebpartikeln in einem *in vivo* Modell reduziert (Bi et al., 2001). Desweiteren kann Endotoxin die mRNA Expression von RANK und COX-2 in Makrophagen erhöhen. Auch die Expression der Osteoklasten assoziierten Gene TRAP und Cathepsin K konnte durch Endotoxin in Makrophagen und ausgereiften Osteoklasten erhöht werden (Hou et al., 2013).

Unserer Kenntnis nach liegen keine Studien vor, die Endotoxinlevel von PPG und SG vergleicht. In dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede im LAL Assay von PPG und SG nachgewiesen werden. Beim Vergleich der PPGs von Patienten mit inflammatorischer Arthritis gegenüber Patienten mit Osteoarthritis konnten erhöhte Endotoxinspiegel den inflammatorischen PPGs zugeordnet werden (Nalepka et al., 2006). In dieser Studie wurden inflammatorische Patienten sowohl im PPG als auch im SG ausgeschlossen. Die ähnlichen Endotoxinlevel dieser Studie könnten auf den Ausschluss von rheumatoiden Patienten zurückzuführen sein. Varianzen im Endotoxinniveau könnten auch auf dem Vorliegen inflammatorischer Prozesse beruhen und nicht durch die Herkunft des Gewebes hervorgerufen werden.

Beim Vergleich von zementierten und zementfreien Endoprothesen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit ein signifikant höheres Expressionniveau für RANK und signifikant niedrigere Expressionen von MMP-13 und ALP in PPGs von zementierten im Vergleich zu zementfreien Endoprothesen. Die Marker M-CSF, TNF α , RANK-L, OPG, Kollagen Typ I sowie TRAP und Cathepsin K zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression.

Für OPG, TRAP, Cathepsin K (Koulouvaris et al., 2008) und TNF α (Jones et al., 1999) zeigen sich auch in der Literatur keine signifikanten Expressionsunterschiede in PPGs von zementfreien und zementierten Endoprothesen.

Gelegentlich werden erhöhte (Stea et al., 2000) oder verminderte (Goodman et al., 1998) TNF α -Werte im PPG zementierter gegenüber zementfreier Prothesen berichtet. Da auch hier rheumatoide Patienten in der Population enthalten sein könnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die TNF α Regulation auf inflammatorische Geschehnisse zurückzuführen ist.

Veigl et al. stellte die Vermutung auf, dass das RANK/RANK-L/OPG System vor allem bei zementierten Endoprothesen zu Lockerungsprozessen beiträgt und bei zementfreien Endoprothesen auch andere Prozesse eine Rolle spielen (Veigl et al., 2007). Unsere Ergebnisse mit signifikant höherer Expression von RANK und einer tendenziell verminderten Expression von OPG im PPG zementierter Endoprothesen könnte diese Theorie stützen.

In PPGs zementfreier Endoprothesen zeigte sich dahingegen eine signifikant vermehrte Expression von ALP und MMP-13. Es ist möglich, dass enzymatische Abbauvorgänge bei zementfreien Endoprothesen eine wichtige Rolle im Lockerungsprozess übernehmen. Weitere Studien sind erforderlich, um genaue Aussagen in diesem Punkt treffen zu können.

In der durchgeführten Studie zeigen sich Genexpressionsvarianzen im Patientenkollektiv. Das Expressionsverhalten scheint sehr stark abhängig vom klinischen Hintergrund der Patienten zu sein. Das als „Goldstandard“ verwendete SG wird kontrollvers betrachtet (Crotti et al., 2004). Das Synovialgewebe zeigt eine sehr ähnliche Zellverteilung wie das periprothetische Gewebe, lediglich ein höherer Anteil an Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten und aktivierten Zellen konnte im PPG gegenüber dem SG gezeigt werden (Perry et al., 1995). Dabei scheint die Herkunft der SG (Hüfte oder Knie) keinen Einfluss auf die Expressionsmuster zu haben (Tomankova et al., 2014). Als bestes Kontrollgewebe würde sich „Synovialgewebe“ von stabilen Endoprothesen eignen, das jedoch nur schwer zu gewinnen ist. Neben dem verwendeten Goldstandard gibt es Studien, die „gesundes“ Synovialgewebe von Patienten die sich einer Kniearthroskopie unterziehen zum Vergleich heranziehen (Crotti et al., 2004; Gallo et al., 2014). In dieser Studie wurde das PPG von Hüft- und Knie totalendoprothesen mit SG von Hüftprothesenerstimplantationen

verglichen. Das Expressionsverhalten des SGs von Knie- und Hüfterstimplantationen unterscheidet sich nicht signifikant und die Lokalisation des entnommenen Gewebes spielt somit eine geringe Rolle (Clarke et al., 2001; Tomankova et al., 2014). Der klinische Hintergrund des Patientenkollektivs scheint jedoch einen Einfluss auf das Expressionsverhalten zu haben (Jansen et al., 2014; Tomankova et al., 2014). Demnach ist es durchaus möglich, dass individuell gewählte Ein- und Ausschlusskriterien z.B. rheumatoide Arthritis zu abweichenden Expressionsmustern führen können. Ein verbesserter „Goldstandard“ und damit ein verbessertes Screening des Patientenkollektivs könnte ein genaueres Bild der aseptischen Endoprothesenlockerung liefern.

Des weiteren könnte die Variabilität der Expressionsmuster auf die Gewebeprobe zurückzuführen sein. Die gewonnenen Gewebeproben zeigen sich insgesamt sehr heterogen. Die Standzeit der Prothese, sowie das Alter des Patienten, die körperliche Aktivität und die angewandten experimentellen Verfahren können einen Einfluss haben (Sundfeldt et al., 2006). Auch die Entnahmestelle der Proben kann einen Einfluss auf das Zytokinmuster haben. Studien zeigen, dass es in Gewebeproben, die an unterschiedlichen Entnahmestellen des gleichen Patienten gewonnen wurden, Unterschiede in Zellzahl, Zellart und Aktivitätszustand der Zellen aufweisen (Goodman et al., 1996; Jones et al., 1999). Das unterstreicht die grosse Vielfalt der aseptischen Lockerung und könnte auf unterschiedliche Stadien der aseptischen Endoprothesenlockerung innerhalb eines Patienten hinweisen (Goodman et al., 1996).

Obwohl es sicherlich von Bedeutung gewesen wäre auf die Beschaffenheit (Art, Anzahl, Form) der Abriebpartikel einzugehen, lag der Schwerpunkt der Studie auf den molekularen Zusammenhängen der aseptischen Lockerung bei Patienten mit „verbessertem Goldstandard“. Durchgeführte *in vitro* Studien zeigen eine grosse Variabilität an Anzahl und Grösse der verwendeten Partikel und interindividuelle Unterschiede in der Zytokinfreisetzung auf gleiche Partikel (Sethi et al., 2003; Yagil-Kelmer et al., 2004). Diese interindividuellen Unterschiede der Patienten scheinen jedoch eine grössere Rolle in der aseptischen Lockerung zu spielen als die durch unterschiedliche Partikel und Grösse ausgelösten Partikelreaktionen (Sundfeldt et al., 2006).

5.2. Zelluläre Komponente bei aseptischer Endoprothesenlockerung

Basierend auf aktuellen Paradigmen, sind periprotehetische Osteolysen Ergebnisse verschiedener Signalkaskaden, welche von unterschiedlichen Zellen als Reaktion auf Abriebpartikel in Gang gesetzt werden (Gallo et al., 2013; Gallo et al., 2014). Bei der aseptischen Endoprothesenlockerung übernehmen periprotehetische Fibroblasten-artige Zellen (PPFs) eine wichtige Rolle (Koreny et al., 2006; Pap et al., 2003; Yao et al., 1995).

Im PPG finden sich neben Makrophagen, Riesenzellen, Osteoblasten auch ein hoher Prozentsatz an Fibroblasten-ähnlichen Zellen (Perry et al., 1995; Veigl et al., 2007; Xu et al., 1997). Das SG enthält neben Fibroblasten-ähnlichen Zellen, Lymphozyten auch CD68 positive Zellen (Crotti et al., 2004; Xu et al., 1997). Immunhistologisch konnten in dieser Arbeit sowohl im PPG als auch im SG positive Zellen für den Makrophagen Marker CD68 und den fibroblastären Marker S100a4 nachgewiesen werden.

Im PPG bilden Fibroblasten-artige Zellen die am stärksten vertretene Zellpopulation (Jiranek et al., 1993; Perry et al., 1995). Fibroblasten produzieren Zytokine, die ossäre Desintegrationsprozesse triggern können (Manlapaz et al., 1996; Sabokbar et al., 2005).

In unsere Studie zeigte sich eine vermehrte Expression der Gene RANK-L, TNF α , Cathepsin K und MMP-13 in (3D) Transwell-Kulturen von PPFs und SFs gegenüber der (2D) Monolayer Kultivierung. Für OPG, Kollagen Typ I sowie ALP konnte eine signifikant niedrigere Expression in 3D Transwellkulturen gegenüber der 2D Kultivierung nachgewiesen werden. M-CSF zeigte eine relativ konstante Expression. Unsere Ergebnisse können wir mit Literaturergebnissen aus 2D Kultivierungen von PPFs, SFs und Hautfibroblasten vergleichen. Für die Kultivierung von PPFs in Transwellkulturen lag uns zum aktuellen Zeitpunkt keine Literatur vor.

PPFs sind in der Lage RANK-L (Koreny et al., 2006; Mandelin et al., 2005; Sabokbar et al., 2005; Sakai et al., 2002; Wei et al., 2009), OPG (Koreny et al., 2006; Mandelin et al., 2005; Tunyogi-Csapo et al., 2007), M-CSF (Koreny et al., 2006),

TNF α (Qian et al., 2008), Cathepsin K (Mandelin et al., 2005) und MMP-13 (Imai et al., 1998; Wagner et al., 2008) zu exprimieren. Nicht nur PPFs zeigen eine Expression der untersuchten Zytokinen. Auch SFs können RANK-L (Dickerson et al., 2012), OPG (Dickerson et al., 2012; Kubota et al., 2004), Cathepsin K (Hou et al., 2002) und MMP-13 (Asano et al., 2006) exprimieren.

Bereits Studien mit Hautfibroblasten zeigen, dass Fibroblasten prinzipiell in der Lage sind Kollagen Typ I (Shu et al., 2014), ALP (Costa-Rodrigues et al., 2010) sowie RANK-L (Quinn et al., 2000), OPG (Quinn et al., 2000), M-CSF (Costa-Rodrigues and Fernandes, 2011; Quinn et al., 2000) und TNF α (Costa-Rodrigues and Fernandes, 2011; Quinn et al., 2000; Sabokbar et al., 2003) zu exprimieren. Je nach Ursprungsherkunft (z.B. Haut oder Gingiva) und Alter zeigen Hautfibroblasten unterschiedliche Expressionsniveaus von M-CSF, RANK-L und OPG (Costa-Rodrigues and Fernandes, 2011). Fibroblasten sind in der Lage, sich in ihrem Expressionsverhalten zu verändern, wenn sie entsprechenden Trigger ausgesetzt werden (Koreny et al., 2006; Quintanilla-Dieck et al., 2009).

Bei der aseptischen Endoprothesenlockerung spielt NF- κ B (RANK-L) als Schlüsselzytokin für die Ausbildung von Osteoklasten eine wichtige Rolle (Nakagawa et al., 1998). PPFs sind in der Lage RANK-L zu exprimieren (Koreny et al., 2006; Quinn et al., 2000; Sakai et al., 2002) und somit die Differenzierung von Osteoklasten zu fördern. In Co-Kulturen von PPFs mit nicht-anhaftenden Knochenmarkszellen (Sakai et al., 2002) oder peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) (Sabokbar et al., 2005) kam es zur Ausbildung von TRAP positiven multinukleären Zellen unter der Anwesenheit von M-CSF. Durch Zugabe von OPG, dem Gegenspieler von RANK-L konnte die Ausbildung der TRAP positiven Zellen vermindert werden (Sabokbar et al., 2005). OPG blockiert somit eine durch Co-Kultur von PPFs mit mononukleären Zellen ohne Zugabe von M-CSF indirekte Ausbildung osteoklastärer Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E2 (PGE2) über seinen Prostaglandin Rezeptor (EP4) auf PPFs die Expression von RANK-L regulieren kann (Tsutsumi et al., 2009). PGE2 ist ein inflammatorischer Mediator der osteoklastären Knochenresorption und zeigt eine vermehrte Expression in Makrophagen und Fibroblasten nach Partikelstimulation (Bukata et al., 2004; Schwab et al., 2006; Suzuki et al., 2007).

PPFs sind auch in der Lage direkt auf Abriebpartikel zu reagieren. PPFs zeigen *in vivo* und *in vitro*, dass sie Abriebpartikel phagozytieren können (Koreny et al., 2006; Tunyogi-Csapo et al., 2007). Durch oxidativen Stress wird in PPFs eine vermehrte Expression von COX-2 über den Calpain-abhängigen NF- κ B Signalweg hervorgerufen (Wei et al., 2009). Die Stimulationen mit Titaniumpartikeln und Zytokinen wie TNF α führt in PPFs zu einer Erhöhung der Expression von RANK-L (Koreny et al., 2006).

In unserer Studie zeigte sich sowohl in PPFs als auch in SFs eine signifikant vermehrte Expression von RANK-L im 3D Transwell System gegenüber der 2D Kultivierung ohne Zugabe jeglicher Stimulationsfaktoren. PPFs exprimierten dabei signifikant mehr RANK-L als SFs. Das veränderte Expressionsverhalten kann dabei durch den vermehrten Zell-Zellkontakt in der Transwellkultur, die Zellakkumulation und durch eine verbesserte Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen induziert werden. Unsere Ergebnisse aus der 2D und 3D Kultivierung lassen die Vermutung zu, dass PPFs einen großen Anteil an der Expression von RANK-L haben und dadurch zu periprosthetischen Osteolysen beitragen.

Es gibt viele Hinweise, dass PPFs neben der normalen Stützfunktion eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Osteolysen während der aseptischen Endoprothesenlockerung spielen (Costa-Rodrigues and Fernandes, 2011; Sakai et al., 2002). PPFs sind in der Lage OPG, den Gegenspieler von RANK-L, zu exprimieren (Koreny et al., 2006; Mandelin et al., 2005). Nach Stimulation von PPFs mit Titaniumpartikeln im Monolayer kommt es nach 12 h zu einem Expressionspeak von OPG und einer anschließenden kontinuierlichen Expressionsabnahme (Koreny et al., 2006). Stimulationen mit TNF α im 2D System führen zu starken Expressionszunahmen von OPG sowohl in PPFs (Mandelin et al., 2005) als auch in SFs (Kubota et al., 2004). In unserer Studie konnten wir eine verminderte Expression von OPG im 3D Transwell System gegenüber dem 2D Monolayer System sehen. In periprosthetischen Grundgeweben, die eine 3D Struktur aufwiesen, zeigen sich konstant niedrige Expressionen von OPG.

Auch die RANK-L/OPG Ratio im 3D System ist signifikant höher als im 2D System und es konnte eine signifikant höhere RANK-L/OPG Ratio (Tag 10) in den PPFs gegenüber den SFs nachgewiesen werden. In der Monolayerkultivierung hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede der RANK-L/OPG Ratio zwischen PPFs und

SFs gesehen werden. Anlehnend an das Grundgewebe, bei dem auch eine signifikant höhere RANK-L/OPG Ratio im PPG gegenüber dem SG zu sehen ist, kann vermutet werden, dass das 3D System den *in vivo* Verhältnissen des periprosthetischen Gewebes näher kommt als eine 2D Kultivierung.

Neben vermehrten RANK-L und niedrigeren OPG Expressionen zeigen sich in der 3D Transwell Kultivierung von PPFs und SFs signifikant vermehrte Expressionen von MMP-13 und eine niedrigere Expression von Kollagen Typ I im Vergleich zum Monolayer. Cathepsin K wird nur von PPFs vermehrt im 3D Transwell System gegenüber dem Monolayer gebildet. Kollagen Typ I bildet mit 90% den größten Anteil der extrazellulären Knochenmatrix und wird von Osteoblasten und Fibroblasten gebildet (Brembilla et al., 2013; Yao et al., 1997). Sowohl MMP-13 als auch Cathepsin K können von PPFs exprimiert werden und tragen durch die Fähigkeit, Kollagen abzubauen einen Teil zur Endoprothesenlockerung bei (Ma et al., 2006; Mandelin et al., 2005). MMP-13 wurde vor allem in der näheren Umgebung von Osteoklasten detektiert und scheint eine Schlüsselrolle bei der Fortbewegung von Osteoklasten zu spielen (Delaisse et al., 2003). Auch SFs reagieren auf eine Stimulation durch TNF α mit einer vermehrten Expression von MMP-13 (Asano et al., 2006) und Cathepsin K (Hou et al., 2002).

Im PPG werden erhöhte Expressionen von MMP-13 (Imai et al., 1998; Takei et al., 2000) und Cathepsin K (Crotti et al., 2004; Koulouvaris et al., 2008) gegenüber Kontrollen gefunden. Sowohl PPFs als auch SFs steigern in unserer Studie ihre Expression von MMP-13 allein durch 3D Kultivierung. Da MMP-13 nicht von Osteoblasten exprimiert wird (Wagner et al., 2008), ist eine Kontamination der Kultur relativ unwahrscheinlich. Die vermehrte Expression von Cathepsin K und MMP-13 könnte in der Entstehung von Knochenosteolysen eine Rolle spielen. Die verminderte Expression von Kollagen Typ I könnte auch ein Hinweis dafür sein, dass es in der 3D Kultivierung zu einer Differenzierungsveränderung der PPFs kommt. Die Expression von Kollagen Typ I, das wichtigste, auch von Fibroblasten gebildete extrazelluläre Matrixprotein nimmt ab, während die Expression von MMP-13, RANK-L und Cathepsin K zunehmen. Dies könnte für eine Reorganisation der extrazellulären Matrix sprechen.

Zwar wird ALP als klassischer Osteoblastenmarker *in vivo* angesehen, es gibt jedoch Studien die zeigen, dass auch Fibroblasten ALP exprimieren können (Costa-

Rodrigues et al., 2010; Weiss et al., 1989). In unserer Studie zeigte an Tag 21 eine signifikant verminderte Expression von ALP in der 3D Kultivierung für PPFs und SFs im Vergleich zum Monolayer. Auch diese Abnahme der ALP Expression spricht gegen eine Kontamination mit Osteoblasten, da vor allem Osteoblasten ALP exprimieren. Das Expressionsmuster von M-CSF, welches für die Osteoklastendifferenzierung notwendig ist, wurde durch die Transwellkultivierung nicht verändert. Für M-CSF konnte eine Aufregulation durch TNF α oder Titaniumpartikel in PPFs innerhalb der ersten 12 h beobachtet werden, danach zeigte sich ein konstantes Expressionsniveau (Koreny et al., 2006). Es ist möglich, dass die von uns beobachteten unveränderten M-CSF Expressionen ein konstantes Expressionslevel darstellen, das nach einer nicht registrierten Expressionszunahme zu einem früheren Zeitpunkt erreicht wurde.

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF α zeigte erst an Tag 21 eine vermehrte Expression im Transwell gegenüber dem 2D System sowohl in PPF- als auch in SF-Kulturen. Die Stimulation mit Titaniumpartikeln führte im Monolayer weder in PPFs noch in SFs zu einer Expressionserhöhung (Koreny et al., 2006). In unserer Studie zeigten sich weder für den Zeitverlauf noch beim Vergleich zwischen PPFs und SFs im Monolayer signifikante Unterschiede. Lediglich die Zugabe von Substanz P, einem Neuropeptid, erhöhte das TNF α Level in PPFs (Qian et al., 2008). TNF α spielt als stimulierendes Zytokin eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von PPFs (Koreny et al., 2006; Mandelin et al., 2005). TNF α könnte durch den Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor p55 (TNFR p55), welcher von PPFs und SFs exprimiert wird, zu einer vermehrten Expression von RANK-L führen und dadurch zur RANK-L abhängigen Osteoklastenbildung beitragen (Koreny et al., 2006).

Wir konnten zeigen, dass es durch die 3D Transwell Kultivierung von PPFs und SFs zu einer Veränderten Expression von RANK-L, OPG, Cathepsin K, MMP-13, Kollagen Typ I, ALP und TNF α kommt. Die erhöhte Zelldichte im 3D gegenüber der 2D Kultivierung sowie der verbesserte Zell-Zell Kontakt könnte zur veränderten Genexpression führen.

Auch Hautfibroblasten zeigen drei Tage nach Erreichen der Konfluenz eine erhöhte Expression von Cathepsin K, welche hier auf engen Zell-Zellkontakt und parakrine Wechselwirkungen zurückgeführt werden (Quintanilla-Dieck et al., 2009).

Der Einsatz von 3T3L1 Fibroblasten auf Transwellmembranen zeigte eine gegenüber der Monolayerkultivierung verbesserte Differenzierung zu Adipozyten. Die Zellen zeigten hier im Transwell ein verbessertes und gleichmäßigeres Wachstum sowie eine verbesserte Differenzierungsrate (Sabater et al., 2013). Der verbesserte Sauerstoff und Nährstoffaustausch durch die permeable Membran könnte zu der gesteigerten Differenzierungsrate geführt haben (Sabater et al., 2013).

Die veränderte Expression der PPFs und SFs im Transwellsystem könnte in unserer Studie auch durch die verbesserte Nährstoffversorgung und einen verbesserten Zell-Zellkontakt zu erklären sein. Die Kultivierung im Transwell System könnte zu einer Zunahme der Differenzierung, eine Art von Re-Differenzierung, in PPFs und SFs führen (Murdoch et al., 2007).

Auch bei anderen Zellarten kam die Verwendung der Transwellkultur zum Einsatz. Die Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf Transwellmembranen zeigte eine verbesserte Differenzierung chondrogener Zellen gegenüber Monolayerkulturen (Murdoch et al., 2007). Die verbesserte Ausbildung einer einheitlichen extrazellulären Matrix wird auch hier auf den verbesserten Diffusionsaustausch von beiden Seiten zurückgeführt (Murdoch et al., 2007). Andere Scaffolds wie Kollagen oder Alginate Hydrogele, welche durch die Zell-Scaffold Oberflächeninteraktion eher einer Monolayerkultur ähneln, könnten die Differenzierung hemmen (Chawla et al., 2015; Murdoch et al., 2007).

Das verwendete dreidimensionale Kultursystem könnte zu einer verbesserten Darstellung des *in vivo* Verhaltens der an dem pathologischen Prozess beteiligten Zellen beitragen und ein gutes Modell für weitere Zellkulturversuche darstellen.

6. Zusammenfassung

Die aseptische Endoprothesenlockerung ist eine der häufigsten Komplikationen des künstlichen Gelenkersatzes. Die derzeitige Hypothese periprotehetischer Osteolysen beruht auf einer inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel der Endoprothesen, das erstmals 1977 von Willert beschrieben wurde. Abriebpartikel werden von Makrophagen, Osteoblasten, Fibroblasten und weiteren Stromazellen phagozytiert und induzieren die Freisetzung von Zytokinen. Die Osteoklastendifferenzierung beginnt nach Bindung von NF- κ B-Ligand (RANK-L) an den NF- κ B Rezeptor (RANK) unter der Anwesenheit des Monozytenkolonien stimulierenden Faktors (M-CSF). Dysregulationen in der RANK L/OPG Achse führen zur vermehrten Knochenresorption und schlussendlich zu periprotehetischen Osteolysen.

Neben den Osteoklasten, welchen die Hauptrolle bei der Entstehung der Osteolysen zugedacht wird, spielen auch periprotehetische Fibroblasten-artige Zellen (PPFs) eine wichtige Rolle bei der aseptischen Endoprothesenlockerung. Der Einfluss der PPFs wurde in Letzter Zeit vermehrt untersucht. Es zeigte sich, dass diese Partikel phagozytieren können und Zytokine freisetzen, die in der Pathogenese der aseptischen Lockerung eine Rolle spielen.

Ziel dieser Studie war es, das periprotehetische Gewebe (PPG) einem breiten molekularen Screening zu unterziehen und das Expressionsverhalten mit dem Synovialgewebe (SG) zu vergleichen. Des weitem wurde das Expressionsverhalten von PPFs sowohl im Monolayer (2D) als auch in einer *in vivo* ähnlicheren Kulturform, der dreidimensionalen (3D) Transwellkultur untersucht. Das Expressionsverhalten der PPFs wurde mit Fibroblasten-artigen Zellen aus Synovialgewebe (SFs) verglichen.

PPGs (n=24) wurden bei Revisionsoperationen gewonnen, als Kontrollgewebe diente SG (n=18) von Patienten, die eine Hüftprothesenerstimplantation erhielten. Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen wurden in allen Gruppen ausgeschlossen (modifizierter Goldstandard). Die Gewebe wurden histologisch (HE und TRAP), immunhistologisch (CD68 und S100a4) sowie quantitativ mittels RT-PCR (RANK, RANK-L, OPG, Kollagen Typ I, ALP, TRAP, Cathepsin K, MMP-13, M-CSF und TNF α) analysiert, Endotoxinlevel wurden bestimmt.

Im PPG zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression der Marker RANK-L, RANK, TRAP, MMP-13, Kollagen Typ I und ALP sowie niedrigere Expressionen von OPG ge-

genüber dem SG. Eine höhere RANK-L/OPG Ratio wurde im PPG detektiert. Keine Unterschiede konnten für M-CSF, TNF α sowie das Endotoxin Screening nachgewiesen werden.

PPFs (n=12) und SFs (n=6) wurden respektive aus PPG und SG isoliert und nach Passagierung (P3) in Monolayer- und Transwellkulturen überführt und für 10 bis 21 Tage kultiviert. Zum Ausschluss osteoklastärer Verunreinigung wurden die PPFs und SFs zu Kulturbeginn histologisch mit TRAP gefärbt. Die Expressionsniveaus der Gene RANK-L, OPG, Cathepsin K, MMP-13, ALP, Kollagen Typ I, M-CSF und TNF α der PPFs und SFs wurden in Monolayer- und Transwellkulturen neben einer immunhistologischen Untersuchung auf den Fibroblastenmarker S100a4 analysiert.

Sowohl zu Kulturbeginn als auch über den Kulturzeitraum konnten keine TRAP positiven Zellen im Monolayer detektiert werden. PPFs zeigen in Transwellkulturen eine vermehrte Expression von RANK-L, Cathepsin K und MMP-13 an den Tagen 10 und 21 und für TNF α an Tag 21. SFs zeigen für RANK-L und MMP-13 sowie TNF α das gleiche Expressionsverhalten wie PPFs. In SFs zeigt Cathepsin K an Tag 10 eine vermehrte Expression im Transwell gegenüber dem Monolayer. Für OPG und Kollagen Typ I zeigte sich sowohl in PPFs als auch in SFs eine verminderte Expression in den Transwell- gegenüber den Monolayerkulturen. Für ALP konnte das nur an Tag 21 beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es im PPG zu einer vermehrten Expression der an der Knochenosteolyse beteiligten Faktoren (RANK-L, RANK, TRAP, MMP-13) und zu einer Erhöhung der RANK-L/OPG Ratio kommt. Die vermehrte Expression von Kollagen Typ I und ALP sind völlig neue Erkenntnisse, die auch klinisch von Relevanz sein könnten. Durch den modifizierten Goldstandard unter Aussparung rheumatoider Erkrankungen basieren die Ergebnisse auf der alleinigen Wirkung von durch die aseptische Lockerung induzierten Prozessen und werden nicht durch eventuell parallel ablaufenden inflammatorischen Prozesse gestört.

Die Kultivierung von PPFs und SFs im 3D System wurde bisher noch nicht beschrieben. Wir konnten mit unseren Ergebnissen zeigen, dass sich das Expressionsverhalten im 3D System vom 2D System unterscheidet. Die vermehrte Expression in Transwellkulturen von RANK-L und MMP-13 sowie signifikant niedrigere Expressionen von Kollagen Typ I und OPG lassen einerseits vermuten, dass PPFs und SFs ein hohes Expressionspotential beinhalten und ihr Differenzierungsverhalten den Um-

gebungsbedingungen sehr gut anpassen können. Der Nachweis eines veränderten und an das *in vivo* Verhalten angepassteren Expressionsverhaltens von PPFs und SFs in den 3D-Transwellkulturen stellt andererseits dieses Kultursystem als erfolgversprechende Alternative für die Darstellung zellulärer Prozesse auch aus dem Bereich der aseptischen Endoprothesenlockerung im Vergleich zu herkömmlichen Monolayerkultursystemen dar. Die genauen molekularen Vorgänge, die zur veränderten Genexpression im Transwell System gegenüber der Monolayerkultivierung geführt haben konnten abschließend nicht geklärt werden und sollten in Zukunft genauer untersucht werden.

Die Pathogenese der aseptischen Endoprothesenlockerung ist ein multifaktorielles Geschehen, wobei die genauen Einflüsse einzelner Faktoren noch weiter analysiert werden müssen und auch in Zukunft ein spannendes Forschungsthema bleiben werden.

7. Publikationen

Teilergebnisse der vorgelegten Arbeit wurden Publiziert:

Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Aseptic Implant Loosening

Eliza S. Hartmann, Miriam I. Köhler, Felicitas Huber, Julia I. Redeker, Baerbel Schmitt, Burkhard Summer, Andreas Fottner, Volkmar Jansson, Susanne Mayer-Wagner

Journal of Orthopaedic Research: 8 MAY 2016, DOI: 10.1002/jor.23274

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen zu einer Veröffentlichung an:

Gene expression of periprosthetic fibroblast-like cells in transwell cultures

Eliza S. Hartmann, Miriam I. Köhler, Felicitas Huber, Sabine Schlüssel, Julia I. Redeker, Burkhard Summer, Volkmar Jansson, Susanne Mayer-Wagner

8. Literaturverzeichnis

- Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Edwards, J., and Teitelbaum, S.L. (1997). Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. *J Clin Invest* 100, 1557-1565.
- Aidinis, V., Plows, D., Haralambous, S., Armaka, M., Papadopoulos, P., Kanaki, M.Z., Koczan, D., Thiesen, H.J., and Kollias, G. (2003). Functional analysis of an arthritogenic synovial fibroblast. *Arthritis research & therapy* 5, R140-157.
- Alcantara, E.H., Lomeda, R.A., Feldmann, J., Nixon, G.F., Beattie, J.H., and Kwun, I.S. (2011). Zinc deprivation inhibits extracellular matrix calcification through decreased synthesis of matrix proteins in osteoblasts. *Mol Nutr Food Res* 55, 1552-1560.
- Altman, G.H., Horan, R.L., Lu, H.H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J.C., and Kaplan, D.L. (2002). Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 23, 4131-4141.
- Asano, K., Sakai, M., Matsuda, T., Tanaka, H., Fujii, K., and Hisamitsu, T. (2006). Suppression of matrix metalloproteinase production from synovial fibroblasts by meloxicam in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 58, 359-366.
- Aspenberg, P., and Van der Vis, H. (1998). Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clinical orthopaedics and related research*, 75-80.
- Atkins, G.J., Welldon, K.J., Holding, C.A., Haynes, D.R., Howie, D.W., and Findlay, D.M. (2009). The induction of a catabolic phenotype in human primary osteoblasts and osteocytes by polyethylene particles. *Biomaterials* 30, 3672-3681.
- Avnet, S., Lamolinara, A., Zini, N., Solimando, L., Quacquarello, G., Granchi, D., Maraldi, N.M., Giunti, A., and Baldini, N. (2006). Effects of antisense mediated inhibition of cathepsin K on human osteoclasts obtained from peripheral blood. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 24, 1699-1708.
- Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., and Guilak, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25, 3211-3222.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., and Kudo, A. (2000). Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *The Journal of biological chemistry* 275, 4858-4864.
- Baharvand, H., Hashemi, S.M., Kazemi Ashtiani, S., and Farrokhi, A. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol* 50, 645-652.
- Baker, B.M., and Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 125, 3015-3024.
- Beidelschies, M.A., Huang, H., McMullen, M.R., Smith, M.V., Islam, A.S., Goldberg, V.M., Chen, X., Nagy, L.E., and Greenfield, E.M. (2008). Stimulation of macrophage TNF α production by orthopaedic wear particles requires activation of the ERK1/2/Egr-1 and NF- κ B pathways but is independent of p38 and JNK. *J Cell Physiol* 217, 652-666.

- Bi, Y., Seabold, J.M., Kaar, S.G., Ragab, A.A., Goldberg, V.M., Anderson, J.M., and Greenfield, E.M. (2001). Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16, 2082-2091.
- Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R., and Gluck, S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855-857.
- Bloemen, V., Schoenmaker, T., de Vries, T.J., and Everts, V. (2010). Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis. *J Cell Physiol* 222, 565-573.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Brandstrom, H., Jonsson, K.B., Vidal, O., Ljunghall, S., Ohlsson, C., and Ljunggren, O. (1998). Tumor necrosis factor-alpha and -beta upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 454-457.
- Brembilla, N.C., Montanari, E., Truchetet, M.E., Raschi, E., Meroni, P., and Chizzolini, C. (2013). Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis research & therapy* 15, R151.
- Brooks, R.A., Wimhurst, J.A., and Rushton, N. (2002). Endotoxin contamination of particles produces misleading inflammatory cytokine responses from macrophages in vitro. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 84, 295-299.
- Bukata, S.V., Gelinis, J., Wei, X., Rosier, R.N., Puzas, J.E., Zhang, X., Schwarz, E.M., Song, X.Y., Griswold, D.E., and O'Keefe, R.J. (2004). PGE2 and IL-6 production by fibroblasts in response to titanium wear debris particles is mediated through a Cox-2 dependent pathway. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 22, 6-12.
- Calvo, M.S., Eyre, D.R., and Gundberg, C.M. (1996). Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17, 333-368.
- Chawla, S., Chameettachal, S., and Ghosh, S. (2015). Probing the role of scaffold dimensionality and media composition on matrix production and phenotype of fibroblasts. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 49, 588-596.
- Cho, D.R., Shanbhag, A.S., Hong, C.Y., Baran, G.R., and Goldring, S.R. (2002). The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 20, 704-713.
- Christenson, R.H. (1997). Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30, 573-593.
- Chung, C., and Burdick, J.A. (2008). Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 243-262.
- Clarke, S.A., Brooks, R.A., Hobby, J.L., Wimhurst, J.A., Myer, B.J., and Rushton, N. (2001). Correlation of synovial fluid cytokine levels with histological and clinical parameters of primary and revision total hip and total knee replacements. *Acta orthopaedica Scandinavica* 72, 491-498.

Cordonnier, T., Layrolle, P., Gaillard, J., Langonne, A., Sensebe, L., Rosset, P., and Sohier, J. (2010). 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering. *Journal of materials science Materials in medicine* 21, 981-987.

Costa-Rodrigues, J., and Fernandes, M.H. (2011). Paracrine-mediated differentiation and activation of human haematopoietic osteoclast precursor cells by skin and gingival fibroblasts. *Cell Prolif* 44, 264-273.

Costa-Rodrigues, J., Teixeira, C.A., Sampaio, P., and Fernandes, M.H. (2010). Characterisation of the osteoclastogenic potential of human osteoblastic and fibroblastic conditioned media. *J Cell Biochem* 109, 205-216.

Crotti, T.N., Smith, M.D., Findlay, D.M., Zreiqat, H., Ahern, M.J., Weedon, H., Hatzinikolous, G., Capone, M., Holding, C., and Haynes, D.R. (2004). Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* 25, 565-573.

Davis, J.C., Jr., Van Der Heijde, D., Braun, J., Dougados, M., Cush, J., Clegg, D.O., Kivitz, A., Fleischmann, R., Inman, R., and Tsuji, W. (2003). Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 48, 3230-3236.

Delaisse, J.M., Andersen, T.L., Engsig, M.T., Henriksen, K., Troen, T., and Blavier, L. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 61, 504-513.

Delaisse, J.M., Boyde, A., Maconnachie, E., Ali, N.N., Sear, C.H., Eeckhout, Y., Vaes, G., and Jones, S.J. (1987). The effects of inhibitors of cysteine-proteinases and collagenase on the resorptive activity of isolated osteoclasts. *Bone* 8, 305-313.

Dickerson, T.J., Suzuki, E., Stanecki, C., Shin, H.S., Qui, H., and Adamopoulos, I.E. (2012). Rheumatoid and pyrophosphate arthritis synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis independently of RANKL, TNF and IL-6. *J Autoimmun* 39, 369-376.

Diehl, P., Hantke, B., Hennig, M., Tschesche, H., Mittelmeier, W., Schmitt, M., and Muehlenweg, B. (2004). Protein expression of MMP-13, uPA, and PAI-1 in pseudocapsular and interface tissue around implants of loose artificial hip joints and in osteoarthritis. *Int J Mol Med* 13, 711-715.

Dowd, J.E., Sychterz, C.J., Young, A.M., and Engh, C.A. (2000). Characterization of long-term femoral-head-penetration rates. Association with and prediction of osteolysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 82-A, 1102-1107.

Everts, V., Delaisse, J.M., Korper, W., and Beertsen, W. (1998). Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13, 1420-1430.

Fan, X., Fan, D., Gewant, H., Royce, C.L., Nanes, M.S., and Rubin, J. (2001). Increasing membrane-bound MCSF does not enhance OPGL-driven osteoclastogenesis from marrow cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E103-111.

Gallo, J., Goodman, S.B., Konttinen, Y.T., Wimmer, M.A., and Holinka, M. (2013). Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms. *Acta biomaterialia* 9, 8046-8058.

Gallo, J., Kaminek, P., Ticha, V., Rihakova, P., and Ditmar, R. (2002). Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 146, 21-28.

Gallo, J., Raska, M., Mrazek, F., and Petrek, M. (2008). Bone remodeling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis. *Physiol Res* 57, 339-349.

Gallo, J., Vaculova, J., Goodman, S.B., Konttinen, Y.T., and Thyssen, J.P. (2014). Contributions of human tissue analysis to understanding the mechanisms of loosening and osteolysis in total hip replacement. *Acta biomaterialia* 10, 2354-2366.

Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F.H., McQueney, M.S., Foged, N.T., Delmas, P.D., and Delaisse, J.M. (1998). The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *The Journal of biological chemistry* 273, 32347-32352.

Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Desnick, R.J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273, 1236-1238.

Gerecht-Nir, S., Cohen, S., Ziskind, A., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Three-dimensional porous alginate scaffolds provide a conducive environment for generation of well-vascularized embryoid bodies from human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng* 88, 313-320.

Gerecht, S., Burdick, J.A., Ferreira, L.S., Townsend, S.A., Langer, R., and Vunjak-Novakovic, G. (2007). Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11298-11303.

Goldring, S.R., Schiller, A.L., Roelke, M., Rourke, C.M., O'Neil, D.A., and Harris, W.H. (1983). The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 65, 575-584.

Goodman, S.B., Huie, P., Song, Y., Schurman, D., Maloney, W., Woolson, S., and Sibley, R. (1998). Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 80, 531-539.

Goodman, S.B., Knoblich, G., O'Connor, M., Song, Y., Huie, P., and Sibley, R. (1996). Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *Journal of biomedical materials research* 31, 421-428.

Gowen, M., Lazner, F., Dodds, R., Kapadia, R., Feild, J., Tavarria, M., Bertoncello, I., Drake, F., Zavarselk, S., Tellis, I., *et al.* (1999). Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14, 1654-1663.

Granchi, D., Amato, I., Battistelli, L., Ciapetti, G., Pagani, S., Avnet, S., Baldini, N., and Giunti, A. (2005). Molecular basis of osteoclastogenesis induced by osteoblasts exposed to wear particles. *Biomaterials* 26, 2371-2379.

Green, T.R., Fisher, J., Matthews, J.B., Stone, M.H., and Ingham, E. (2000). Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *Journal of biomedical materials research* 53, 490-497.

- Greenfield, E.M., Beidelschies, M.A., Tatro, J.M., Goldberg, V.M., and Hise, A.G. (2010). Bacterial pathogen-associated molecular patterns stimulate biological activity of orthopaedic wear particles by activating cognate Toll-like receptors. *The Journal of biological chemistry* 285, 32378-32384.
- Greenfield, E.M., Bi, Y., Ragab, A.A., Goldberg, V.M., Nalepka, J.L., and Seabold, J.M. (2005). Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72, 179-185.
- Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F., and Heymann, D. (2003). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 163, 2021-2031.
- Hartmann, E.S., Kohler, M.I., Huber, F., Redeker, J.I., Schmitt, B., Schmitt-Sody, M., Summer, B., Fottner, A., Jansson, V., and Mayer-Wagner, S. (2016). Factors regulating bone remodelling processes in aseptic implant loosening. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*.
- Hartmann, E.S., Köhler, M.I., Huber, F., Schlüssel, S., Redeker, J.I., Summer, B., Jansson, V., and Mayer-Wagner, S. (B). Gene expression of periprosthetic fibroblast-like cells in transwell cultures.
- Haynes, D.R., Crotti, T.N., Loric, M., Bain, G.I., Atkins, G.J., and Findlay, D.M. (2001). Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)* 40, 623-630.
- Hercus, B., and Revell, P.A. (2001). Phenotypic characteristics of T lymphocytes in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints. *Journal of materials science Materials in medicine* 12, 1063-1067.
- Hofbauer, L.C., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., and Khosla, S. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25, 255-259.
- Hong, H., Park, Y.K., Choi, M.S., Ryu, N.H., Song, D.K., Suh, S.I., Nam, K.Y., Park, G.Y., and Jang, B.C. (2009). Differential down-regulation of COX-2 and MMP-13 in human skin fibroblasts by glucosamine-hydrochloride. *J Dermatol Sci* 56, 43-50.
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H., and Tabata, Y. (2006). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 27, 4079-4086.
- Hou, G.Q., Guo, C., Song, G.H., Fang, N., Fan, W.J., Chen, X.D., Yuan, L., and Wang, Z.Q. (2013). Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 32, 503-510.
- Im, G.I., Shin, Y.W., and Lee, K.B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13, 845-853.
- Imai, S., Konttinen, Y.T., Juppunen, M., Lindy, O., Ceponis, A., Kemppinen, P., Sorsa, T., Santavirta, S., Xu, J.W., and Lopez-Otin, C. (1998). High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 80, 701-710.

- Jamsen, E., Kouri, V.P., Olkkonen, J., Cor, A., Goodman, S.B., Konttinen, Y.T., and Pajarinen, J. (2014). Characterization of macrophage polarizing cytokines in the aseptic loosening of total hip replacements. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 32, 1241-1246.
- Jiranek, W.A., Machado, M., Jasty, M., Jevsevar, D., Wolfe, H.J., Goldring, S.R., Goldberg, M.J., and Harris, W.H. (1993). Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 75, 863-879.
- Jones, L.C., Frondoza, C., and Hungerford, D.S. (1999). Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components. *Journal of biomedical materials research* 48, 889-898.
- Kadoya, Y., al-Saffar, N., Kobayashi, A., and Revell, P.A. (1994). The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells. *Bone Miner* 27, 85-96.
- Kim, J.H., and Kim, N. (2014). Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab* 21, 233-241.
- Kim, S.G., Lee, D.S., Lee, S., and Jang, J.H. (2014). Osteocalcin/fibronectin-functionalized collagen matrices for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part A*.
- Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Kohara, H., Yoshimatsu, M., and Takano-Yamamoto, T. (2013). Immunological reaction in TNF-alpha-mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol* 2013, 181849.
- Kitazawa, R., Kimble, R.B., Vannice, J.L., Kung, V.T., and Pacifici, R. (1994). Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest* 94, 2397-2406.
- Knight, E., and Przyborski, S. (2014). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat*.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., *et al.* (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191, 275-286.
- Konttinen, Y.T., Takagi, M., Mandelin, J., Lassus, J., Salo, J., Ainola, M., Li, T.F., Virtanen, I., Liljestrom, M., Sakai, H., *et al.* (2001). Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16, 1780-1786.
- Koreny, T., Tunyogi-Csapo, M., Gal, I., Vermes, C., Jacobs, J.J., and Glant, T.T. (2006). The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis. *Arthritis Rheum* 54, 3221-3232.
- Koulouvaris, P., Ly, K., Ivashkiv, L.B., Bostrom, M.P., Nestor, B.J., Sculco, T.P., and Purdue, P.E. (2008). Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26, 106-116.
- Kubota, A., Hasegawa, K., Suguro, T., and Koshihara, Y. (2004). Tumor necrosis factor-alpha promotes the expression of osteoprotegerin in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 31, 426-435.

- Kudo, O., Fujikawa, Y., Itonaga, I., Sabokbar, A., Torisu, T., and Athanasou, N.A. (2002). Proinflammatory cytokine (TNF α /IL-1 α) induction of human osteoclast formation. *J Pathol* 198, 220-227.
- Kwansa, A.L., De Vita, R., and Freeman, J.W. (2014). Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I. *Matrix Biol* 34, 161-169.
- Lam, J., Takeshita, S., Barker, J.E., Kanagawa, O., Ross, F.P., and Teitelbaum, S.L. (2000). TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106, 1481-1488.
- Lieder, R., Petersen, P.H., and Sigurjonsson, O.E. (2013). Endotoxins-the invisible companion in biomaterials research. *Tissue Eng Part B Rev* 19, 391-402.
- Lindeman, J.H., Hanemaaijer, R., Mulder, A., Dijkstra, P.D., Szuhai, K., Bromme, D., Verheijen, J.H., and Hogendoorn, P.C. (2004). Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. *Am J Pathol* 165, 593-600.
- Liu, Y., Zhang, Y., Lin, L., Lin, F., Li, T., Du, H., Chen, R., Zheng, W., and Liu, N. (2013). Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the axonal outgrowth through activation of PI3K/AKT signaling in primary cortical neurons followed oxygen-glucose deprivation injury. *PLoS One* 8, e78514.
- Lochner, K., Fritsche, A., Jonitz, A., Hansmann, D., Mueller, P., Mueller-Hilke, B., and Bader, R. (2011). The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles. *International journal of molecular medicine* 28, 1055-1063.
- Ma, G.F., Ali, A., Verzijl, N., Hanemaaijer, R., TeKoppele, J., Konttinen, Y.T., and Salo, J. (2006). Increased collagen degradation around loosened total hip replacement implants. *Arthritis Rheum* 54, 2928-2933.
- Maitra, R., Follenzi, A., Yaghoobian, A., Montagna, C., Merlin, S., Cannizzo, E.S., Hardin, J.A., Cobelli, N., Stanley, E.R., and Santambrogio, L. (2010). Dendritic cell-mediated in vivo bone resorption. *J Immunol* 185, 1485-1491.
- Mandelin, J., Li, T.F., Hukkanen, M., Liljestrom, M., Salo, J., Santavirta, S., and Konttinen, Y.T. (2005). Interface tissue fibroblasts from loose total hip replacement prosthesis produce receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and cathepsin K. *J Rheumatol* 32, 713-720.
- Mandelin, J., Li, T.F., Liljestrom, M., Kroon, M.E., Hanemaaijer, R., Santavirta, S., and Konttinen, Y.T. (2003). Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 85, 1196-1201.
- Manlapaz, M., Maloney, W.J., and Smith, R.L. (1996). In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 14, 465-472.
- Murdoch, A.D., Grady, L.M., Ablett, M.P., Katopodi, T., Meadows, R.S., and Hardingham, T.E. (2007). Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells* 25, 2786-2796.
- Mushahary, D., Wen, C., Kumar, J.M., Lin, J.X., Harishankar, N., Hodgson, P., Pande, G., and Li, Y.C. (2014). Collagen type-I leads to in vivo matrix mineralization and secondary stabilization of Mg-Zr-Ca alloy implants. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 122, 719-728.

- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., and Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 253, 395-400.
- Nalepka, J.L., and Greenfield, E.M. (2004). Detection of bacterial endotoxin in human tissues. *Biotechniques* 37, 413-417.
- Nalepka, J.L., Lee, M.J., Kraay, M.J., Marcus, R.E., Goldberg, V.M., Chen, X., and Greenfield, E.M. (2006). Lipopolysaccharide found in aseptic loosening of patients with inflammatory arthritis. *Clinical orthopaedics and related research* 451, 229-235.
- Neale, S.D., Sabokbar, A., Howie, D.W., Murray, D.W., and Athanasou, N.A. (1999). Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 release by periprosthetic cells stimulates osteoclast formation and bone resorption. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17, 686-694.
- Noordin, S., and Masri, B. (2012). Periprosthetic osteolysis: genetics, mechanisms and potential therapeutic interventions. *Can J Surg* 55, 408-417.
- Otero, K., Turnbull, I.R., Poliani, P.L., Vermi, W., Cerutti, E., Aoshi, T., Tassi, I., Takai, T., Stanley, S.L., Miller, M., *et al.* (2009). Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and beta-catenin. *Nature Immunology* 10, 734-U790.
- Pap, G., Machner, A., Rinnert, T., Horler, D., Gay, R.E., Schwarzberg, H., Neumann, W., Michel, B.A., Gay, S., and Pap, T. (2001). Development and characteristics of a synovial-like interface membrane around cemented tibial hemiarthroplasties in a novel rat model of aseptic prosthesis loosening. *Arthritis Rheum* 44, 956-963.
- Pap, T., Claus, A., Ohtsu, S., Hummel, K.M., Schwartz, P., Drynda, S., Pap, G., Machner, A., Stein, B., George, M., *et al.* (2003). Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells. *Arthritis research & therapy* 5, R163-173.
- Perry, M.J., Mortuza, F.Y., Ponsford, F.M., Elson, C.J., and Atkins, R.M. (1995). Analysis of cell types and mediator production from tissues around loosening joint implants. *Br J Rheumatol* 34, 1127-1134.
- Przekora, A., and Ginalska, G. (2015). Enhanced differentiation of osteoblastic cells on novel chitosan/beta-1,3-glucan/bioceramic scaffolds for bone tissue regeneration. *Biomed Mater* 10, 015009.
- Purdue, P.E., Koulouvaris, P., Nestor, B.J., and Sculco, T.P. (2006). The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J* 2, 102-113.
- Qian, Y.B., Zeng, B.F., Zhang, X.L., and Jiang, Y. (2008). Substance P stimulates production of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha in fibroblasts from hip periprosthetic membrane. *Journal of Arthroplasty* 23, 581-585.
- Queally, J.M., Devitt, B.M., Butler, J.S., Malizia, A.P., Murray, D., Doran, P.P., and O'Byrne, J.M. (2009). Cobalt ions induce chemokine secretion in primary human osteoblasts. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 855-864.
- Quinn, J.M., Horwood, N.J., Elliott, J., Gillespie, M.T., and Martin, T.J. (2000). Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast

differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15, 1459-1466.

Quintanilla-Dieck, M.J., Codriansky, K., Keady, M., Bhawan, J., and Runger, T.M. (2009). Expression and regulation of cathepsin K in skin fibroblasts. *Experimental Dermatology* 18, 596-602.

Ragab, A.A., Van De Motter, R., Lavish, S.A., Goldberg, V.M., Ninomiya, J.T., Carlin, C.R., and Greenfield, E.M. (1999). Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17, 803-809.

Ramachandran, R., Goodman, S.B., and Smith, R.L. (2006). The effects of titanium and polymethylmethacrylate particles on osteoblast phenotypic stability. *Journal of biomedical materials research Part A* 77, 512-517.

Ramage, S.C., Urban, N.H., Jiranek, W.A., Maiti, A., and Beckman, M.J. (2007). Expression of RANKL in osteolytic membranes: association with fibroblastic cell markers. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 89, 841-848.

Sabater, D., Fernandez-Lopez, J.A., Remesar, X., and Alemany, M. (2013). The use of Transwells (TM) improves the rates of differentiation and growth of cultured 3T3L1 cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 5605-5610.

Sabokbar, A., Itonaga, I., Sun, S.G., Kudo, O., and Athanasou, N.A. (2005). Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 23, 511-519.

Sabokbar, A., Kudo, O., and Athanasou, N.A. (2003). Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 21, 73-80.

Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., and von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13453-13458.

Sakai, H., Jingushi, S., Shuto, T., Urabe, K., Ikenoue, T., Okazaki, K., Kukita, T., Kukita, A., and Iwamoto, Y. (2002). Fibroblasts from the inner granulation tissue of the pseudocapsule in hips at revision arthroplasty induce osteoclast differentiation, as do stromal cells. *Ann Rheum Dis* 61, 103-109.

Sassi, M.L., Eriksen, H., Risteli, L., Niemi, S., Mansell, J., Gowen, M., and Risteli, J. (2000). Immunochemical characterization of assay for carboxyterminal telopeptide of human type I collagen: loss of antigenicity by treatment with cathepsin K. *Bone* 26, 367-373.

Sato, T., Foged, N.T., and Delaisse, J.M. (1998). The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13, 59-66.

Schwab, L.P., Xing, Z., Hasty, K.A., and Smith, R.A. (2006). Titanium particles and surface-bound LPS activate different pathways in IC-21 macrophages. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 79, 66-73.

Schwarz, E.M., Lu, A.P., Goater, J.J., Benz, E.B., Kollias, G., Rosier, R.N., Puzas, J.E., and O'Keefe, R.J. (2000). Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB

signaling in periprosthetic osteolysis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 18, 472-480.

Sethi, R.K., Neavyn, M.J., Rubash, H.E., and Shanbhag, A.S. (2003). Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE. *Biomaterials* 24, 2561-2573.

Shu, B., Xie, J.L., Xu, Y.B., Yu, J.X., Shi, Y., Liu, J., Wang, P., Liu, X.S., and Qi, S.H. (2014). Directed differentiation of skin-derived precursors into fibroblast-like cells. *International journal of clinical and experimental pathology* 7, 1478-1486.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.

Soderstrom, M., Ekfors, T., Bohling, T., Aho, A., Aro, H.T., and Vuorio, E. (2001). Cysteine proteinases in chondrosarcomas. *Matrix Biol* 19, 717-725.

Sokos, D., Everts, V., and de Vries, T.J. (2014). Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res*.

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464.

Stea, S., Visentin, M., Granchi, D., Ciapetti, G., Donati, M.E., Sudanese, A., Zanotti, C., and Toni, A. (2000). Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine* 12, 1575-1579.

Sun, Z.L., Wataha, J.C., and Hanks, C.T. (1997). Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *Journal of biomedical materials research* 34, 29-37.

Sundfeldt, M., Carlsson, L.V., Johansson, C.B., Thomsen, P., and Gretzer, C. (2006). Aseptic loosening, not only a question of wear - A review of different theories. *Acta Orthop* 77, 177-197.

Suzuki, Y., Nishiyama, T., Hasuda, K., Fujishiro, T., Niikura, T., Hayashi, S., Hashimoto, S., and Kurosaka, M. (2007). Effect of etidronate on COX-2 expression and PGE(2) production in macrophage-like RAW 264.7 cells stimulated by titanium particles. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 12, 568-577.

Takahashi, N., Ejiri, S., Yanagisawa, S., and Ozawa, H. (2007). Regulation of osteoclast polarization. *Odontology* 95, 1-9.

Takahashi, N., Udagawa, N., and Suda, T. (2014). Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep* 3, 495.

Takei, I., Takagi, M., Santavirta, S., Ida, H., Ishii, M., Ogino, T., Ainola, M., and Konttinen, Y.T. (2000). Messenger ribonucleic acid expression of 16 matrix metalloproteinases in bone-implant interface tissues of loose artificial hip joints. *Journal of biomedical materials research* 52, 613-620.

Tomankova, T., Kriegova, E., Fillerova, R., Luzna, P., Ehrmann, J., and Gallo, J. (2014). Comparison of periprosthetic tissues in knee and hip joints: differential expression of CCL3 and DC-STAMP in total knee and hip arthroplasty and similar cytokine profiles in primary knee and hip osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 1851-1860.

Trowell, O.A. (1954). A modified technique for organ culture in vitro. *Exp Cell Res* 6, 246-248.

Tsutsumi, R., Xie, C., Wei, X., Zhang, M., Zhang, X., Flick, L.M., Schwarz, E.M., and O'Keefe, R.J. (2009). PGE2 signaling through the EP4 receptor on fibroblasts upregulates RANKL and stimulates osteolysis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24, 1753-1762.

Tunyogi-Csapo, M., Koreny, T., Vermes, C., Galante, J.O., Jacobs, J.J., and Glant, T.T. (2007). Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25, 1378-1388.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

Varas, L., Ohlsson, L.B., Honeth, G., Olsson, A., Bengtsson, T., Wiberg, C., Bockermann, R., Jarnum, S., Richter, J., Pennington, D., *et al.* (2007). Alpha10 integrin expression is up-regulated on fibroblast growth factor-2-treated mesenchymal stem cells with improved chondrogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev* 16, 965-978.

Veigl, D., Niederlova, J., and Krystufkova, O. (2007). Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. *Physiol Res* 56, 455-462.

Vergani, L., Grattarola, M., and Nicolini, C. (2004). Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1447-1461.

Vermes, C., Chandrasekaran, R., Jacobs, J.J., Galante, J.O., Roebuck, K.A., and Glant, T.T. (2001). The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 83-A, 201-211.

Wagner, S., Gollwitzer, H., Wernicke, D., Langer, R., Siebenrock, K.A., and Hofstetter, W. (2008). Interface membrane fibroblasts around aseptically loosened endoprostheses express MMP-13. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26, 143-152.

Walsh, M.C., and Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 5, 511.

Wei, X., Zhang, X., Flick, L.M., Drissi, H., Schwarz, E.M., and O'Keefe, R.J. (2009). Titanium particles stimulate COX-2 expression in synovial fibroblasts through an oxidative stress-induced, calpain-dependent, NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C310-320.

Weiss, M.J., Ray, K., Fallon, M.D., Whyte, M.P., Fedde, K.N., Lafferty, M.A., Mulivor, R.A., and Harris, H. (1989). Analysis of liver/bone/kidney alkaline phosphatase mRNA, DNA, and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia. *American journal of human genetics* 44, 686-694.

Wojdasiewicz, P., Poniatowski, L.A., and Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014, 561459.

Xu, J.W., Konttinen, Y.T., Lassus, J., Natah, S., Ceponis, A., Solovieva, S., Aspenberg, P., and Santavirta, S. (1996). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR). *Clin Exp Rheumatol* 14, 643-648.

Xu, J.W., Konttinen, Y.T., Waris, V., Patiala, H., Sorsa, T., and Santavirta, S. (1997). Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) is increased in the synovial-like membrane of the periprosthetic tissues in the aseptic loosening of total hip replacement (THR). *Clin Rheumatol* 16, 243-248.

Yagil-Kelmer, E., Kazmier, P., Rahaman, M.N., Bal, B.S., Tessman, R.K., and Estes, D.M. (2004). Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to two different sizes of alumina ceramic particles. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 22, 832-838.

Yao, G.Q., Sun, B.H., Weir, E.C., and Insogna, K.L. (2002). A role for cell-surface CSF-1 in osteoblast-mediated osteoclastogenesis. *Calcif Tissue Int* 70, 339-346.

Yao, J., Cs-Szabo, G., Jacobs, J.J., Kuettner, K.E., and Glant, T.T. (1997). Suppression of osteoblast function by titanium particles. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 79, 107-112.

Yao, J., Glant, T.T., Lark, M.W., Mikecz, K., Jacobs, J.J., Hutchinson, N.I., Hoerrner, L.A., Kuettner, K.E., and Galante, J.O. (1995). The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: fibroblast response to titanium particles. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10, 1417-1427.

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarabzol
ALP	Alkalische Phosphatase
α -MEM	Alpha-Medium
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
g	Beschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
IL-1 oder 6	Interleukin-1 oder -6
IQR	Interquartilsabstand
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MMP 13	Matrix Metallopeptidase 13
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
OA	Osteoarthritis
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandin E2
PPF	Periprothetische Fibroblasten-ähnliche Zellen
PPG	Periprothetisches Gewebe
qRT-PCR	Quantitative reverse Transkriptase - polymerase Kettenreaktion
RANK	Rezeptor Aktivator NF- κ B
RANK-L	Rezeptor Aktivator NF- κ B- Ligand
RT	Raumtemperatur
RPM	Revolutions per minute

Abkürzungsverzeichnis

SF	Fibroblasten-ähnliche Zellen aus Synovialgewebe
SG	Synovialgewebe
STD	Standardkurve
Tab.	Tabelle
THA	Totaler Hüftgelenkersatz
TKA	Totaler Kniegelenkersatz
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
4% PFA	4% Paraformaldehyd

10. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Darstellung der zellulären und molekularen Wege der Osteoklastogenese nach Purdue et al. (Purdue et al., 2006).
- Abb. 3.1 Aufarbeitung des Gewebe
- Abb. 4.1 Periprothetisches Gewebe (PPG) mit CD68 (braun) und S100a4 (rosa) Doppelfärbung. Abriebpartikel stellen sich hier nicht nur in multinukleären CD68 positiven Zellen (Stern) dar, sondern auch in Zellen, welche nur positiv für S100a4 (Pfeil) sind.
Balken = 20µm (Hartmann et al., 2016).
- Abb. 4.2 TRAP Färbung zeigt eine multinukleäre Zelle in einer Knochenlakune.
Balken = 50µm (Hartmann et al., 2016).
- Abb. 4.3 Serienschnitte von PPG aus aseptischen Endoprothesenlockerungen, die mit TRAP (A), CD68 (B) und dem fibroblastären Marker S100a4 (C) angefärbt wurden. Es zeigt sich eine multinukleäre Zelle, die positiv für TRAP und CD68 färbt. Im Umfeld dieser multinukleären Zelle befinden sich Fibroblasten ähnliche S100a4 positive Zellen.
Balken = 20µm (Hartmann et al., 2016).
- Abb. 4.4 Darstellung der relativen mRNA Expressionsunterschiede (Ratio target Gen/ Ratio GAPDH) zwischen PPG und SG für die Gene M-CSF (A), TNF α (B), RANK (C), RANK-L (D), OPG (E), TRAP (F), Cathepsin K (G), MMP-13 (H), ALP (I) und Kollagen Typ I (K). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., 2016) .
- Abb. 4.5 Darstellung der Patientenbezogenen RANK-L/OPG Ratio. Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert (Hartmann et al., 2016).
- Abb. 4.6 Darstellung der Endotoxinlevel von PPG und SG in EU/ml. Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert (Hartmann et al., 2016).
- Abb. 4.7 Kultivierung von PPFs (A - C) und SFs (D - F) im Monolayer. Bilder A bis F sind Lichtmikroskopische Aufnahmen nach TRAP Färbung im 24 Well. Es zeigen sich an den Tagen 1 (A und D), 10 (B und E) sowie 21 (C und

F) keine TRAP positiven Zellen in der Monokultur. Die Zellen zeigen alle eine fibroblastenartige spindelförmige Morphologie.

Balken = 100µm (Hartmann et al., B).

Abb. 4.8 Dreidimensionale Kultivierung von PPFs auf einer Transwellmembran an den Tagen 10 (A und B) und 21 (C und D). Immunhistologische Anfärbung mit dem fibroblastären Marker S100a4 (A - D).

Maßstabsbalken = 20µm (Hartmann et al., B).

Abb. 4.9 Dreidimensionale Kultivierung von SFs auf einer Transwellmembran an den Tagen 10 (A und B) und 21 (C und D). Immunhistologische Anfärbung mit dem fibroblastären Marker S100a4 (A - D).

Maßstabsbalken = 20µm (Hartmann et al., B).

Abb. 4.10 Darstellung des Expressionsverhaltens von RANK-L der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Abb. 4.11 Darstellung des Expressionsverhaltens von OPG der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Abb. 4.12 Darstellung des RANK-L/OPG Ratio in PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Abb. 4.13 Darstellung des Expressionsverhaltens von Cathepsin K der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

Abb. 4.14 Darstellung des Expressionsverhaltens von MMP-13 der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

- Abb. 4.15 Darstellung des Expressionsverhaltens von M-CSF der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).
- Abb. 4.16 Darstellung des Expressionsverhaltens von TNF α der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).
- Abb. 4.17 Darstellung des Expressionsverhaltens von ALP der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).
- Abb. 4.18 Darstellung des Expressionsverhaltens von Kollagen Typ I der PPFs (A) und SFs (B) über einen Zeitraum von 21 Tagen (d). Der Median wird durch den horizontalen Balken und die IQR durch die Fehlerbalken repräsentiert. Signifikante p-Werte sind angegeben (Hartmann et al., B).

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1.	Einfriermedium
Tab. 3.2	Zusammensetzung Transportmedium
Tab. 3.3	Zusammensetzung Waschmedium
Tab. 3.4	Zusammensetzung Medium für isolierte Fibroblasten-ähnliche Zellen
Tab. 3.5	Zusammensetzung Master Mix für cDNA Synthese
Tab. 3.6	Zusammensetzung des Master Mix für die Real Time PCR
Tab. 3.7	Programm für GAPDH, M-CSF, RANK und RANK-L
Tab. 3.8	Programm für Cathepsin K
Tab. 3.9	Programm für Kollagen Typ I und TRAP
Tab. 3.10	Programm für ALP
Tab. 3.11	Programm für OPG und TNF α
Tab. 3.12	Programm für MMP-13
Tab. 4.1	Tabellarische Übersicht der Patientendaten.
Tab. 4.2	Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen zementierten und zementfreien aseptischen Endoprothesenlockerungen. Ergebnisse sind normalisiert gegen GAPDH. Die mRNA Unterschiede wurden mit dem Man-Whitney-U Test durchgeführt. Es wird Median mit IQR angegeben. Signifikante p-Werte sind mit * gekennzeichnet.

Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. med. Susanne Mayer für die Vergabe des spannenden Themenbereiches und ganz besonders für die ausgezeichnete und liebevolle Betreuung und Unterstützung. Vielen Dank für die produktiven Vorschläge, Korrekturen und immer aufbauenden Worte während der ganzen Phase.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Bärbel Schmitt und Julia Redeker, für die wunderbare Einführung in die Welt der Immunhistochemie sowie quantitativen Real-Time-PCR. Ohne Eure herzliche Begleitung, die vielen Ratschläge und Eure tatkräftige Hilfe im Labor wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch bei unserem Kooperationspartner Herr Dr. Burkhard Summer möchte ich mich für die fortwährende Hilfe bei Fragen rund um die quantitative Real-Time-PCR bedanken. Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Alexander Crispin der mir zu den kniffligen Fragen Rund um die Statistik immer eine große Unterstützung war.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Humanmedizinstudium sowie meine Dissertation niemals möglich gewesen wären. Vielen lieben Dank für Eure bedingungslose Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Hartmann, Eliza Sophie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Analyse molekularer und zellulärer Komponenten des periprothetischen Gewebes bei
aseptischer Endoprothesenlockerung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Bern, 25.06.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand